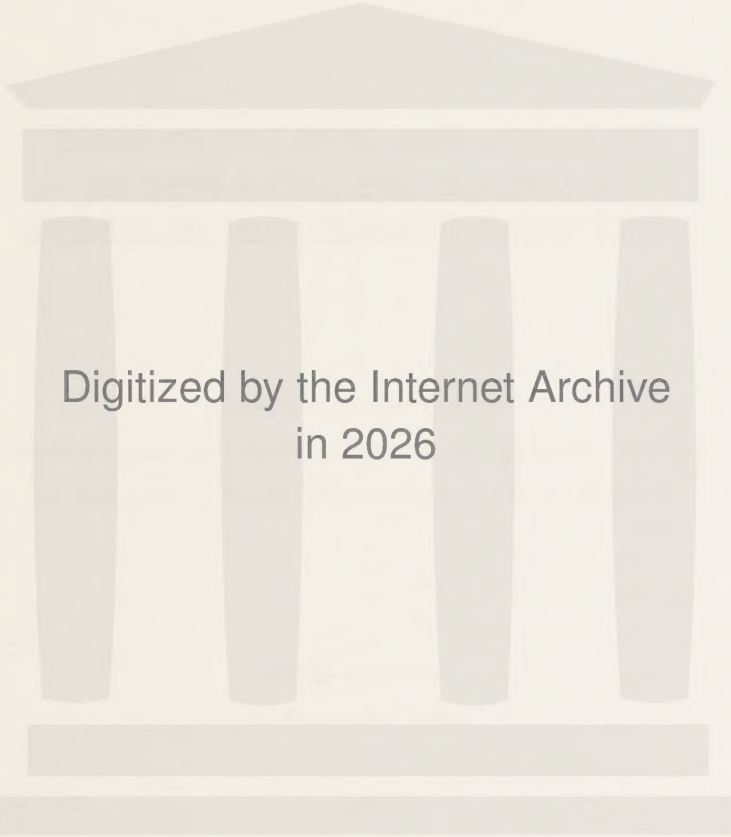


ENTWICKLUNG
EINES ENZYME IMMUNO ASSAY
(ELISA) ZUM NACHWEIS
SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER
DER IGM-KLASSE BEI AKUTEN
COXSACKIE-B-VIRUSINFEKTIONEN

Wolfgang Kalleder

Diss
München
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554826_0082

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und
Medizinische Mikrobiologie der Universität München

Direktor: Professor Dr. med. F. Deinhardt

ENTWICKLUNG EINES ENZYME IMMUNO ASSAY (ELISA)
ZUM NACHWEIS SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER DER
IGM-KLASSE BEI AKUTEN COXSACKIE-B-VIRUSINFEKTIONEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Kalleder

aus
Baldham

Jahr
1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. M. Roggendorf
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. S. Deinhardt
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 1985

1	Einleitung	5
1.1	Klassifikation und Charakteristika der Coxsackie-Viren	5
1.2	Epidemiologie der Coxsackie-Viren	6
1.3	Erkrankungen des Menschen bei Coxsackie- B-Infektionen	9
1.3.1	Allgemeines	9
1.3.2	Herzerkrankungen und Morbus Bornholm	10
1.3.3	Erkrankungen des ZNS	14
1.3.4	Andere Erkrankungen	15
1.4	Methoden zum Nachweis einer Coxsackie-B- Infektion	16
1.4.1	Virusisolierung	16
1.4.2	Serologische Nachweismethoden	18
1.4.2.1	Neutralisationstest	18
1.4.2.2	Komplementbindungsreaktion, Hämaggluti- nationshemmtest, Immunfluoreszenz, Gel- Doppel-Difussion und Counterimmunoelec- trophorese	19
1.4.2.3	Elisa-Teste (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	21
1.5	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Material und Methoden	25
2.1	Seren	25

2.2	Herstellung der Reagenzien für den Elisa	25
2.2.1	Viruszüchtung	26
2.2.2	Virusreinigung	27
2.2.3	Bestimmung der Konzentration im infektiösen Virus	29
2.2.4	Herstellung der Antiseren	29
2.2.5	IgG-Präparation	30
2.2.6	Antikörper-Titer-Bestimmung der Antiseren	31
2.2.7	Peroxidase-Kopplung	32
2.2.8	Bestimmung der Antigenkonzentration im Sandwich-Test	33
2.2.9	Durchführung des Elisa zum Nachweis von Coxsackie-B-IgM-Antikörpern	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Virus-Präparation	35
3.2	IgG-Präparation	38
3.3	Peroxidase-Kopplung	40
3.4	Bestimmung der optimalen Antigenkonzentrationen für den Elisa zum Nachweis von Coxsackie-B-IgM-Antikörpern	40
3.5	Bestimmung der Empfindlichkeit des Elisa zum Nachweis von Coxsackie-B-IgM-Antikörpern	45
3.6	Bestimmung der Persistenz von Antikörpern der IgM-Klasse im Elisa zum Nachweis von Coxsackie-B-IgM-Antikörpern	48

3.7	Kreuzreaktionen von Seren mit verschiedenen Virusinfektionen im Elisa zum Nachweis von Cocksackie-B-IgM-Antikörpern	48
3.8	Ergebnisse der Testung von Seren von Patienten mit einer Cocksackie-B-Infektion	52

4	Diskussion	58
---	------------	----

5	Zusammenfassung	63
---	-----------------	----

	Literaturverzeichnis	66
--	----------------------	----

Danksagungen

Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Klassifikation und Charakteristika der Coxsackie-Viren

Die Coxsackie-B-Viren wurden bei der Erforschung der Poliomyelitis entdeckt (33) und erstmals 1948 von Dalldorf und Sickles beschrieben. Sie wurden zuerst aus dem Stuhl von 2 Kindern isoliert, die an Symptomen erkrankt waren, die der paralytischen Poliomyelitis ähnelten (14). Bei weiteren Versuchen entdeckte man eine Reihe ähnlicher Typen, die alle beim Menschen auftraten und benannte sie Coxsackie-Viren nach dem Wohnort der ersten beiden Patienten, Coxsackie im amerikanischen Bundesstaat New York (11). Aufgrund histopathologischer Unterschiede bei infizierten neugeborenen Mäusen wurden die Coxsackie-Viren dann in die Gruppen A und B unterteilt.

Diejenigen Coxsackiestämme, die bei infizierten Mäusen zu generalisierten degenerativen Veränderungen der quergestreiften Muskulatur und schlaffen Paresen führen, werden der Untergruppe A zugeordnet. Die Stämme, die hauptsächlich Veränderungen in einzelnen Muskeln mit spastischen Paresen, sowie Läsionen im Fettgewebe, im ZNS und in einzelnen Organen wie dem Pankreas verursachen, werden zur Untergruppe B zusammengefaßt (20). Die Gruppe A besteht aus 24, die Gruppe B aus 6 serologisch differenzierbaren Typen (7, 38, 24). Die Coxsackie-Viren A und B bilden zusammen mit den Polio-

myelitisviren, den Echo-Viren und dem Hepatitis-A-Virus die Gattung der Enteroviren, da sie sich physikalisch, biologisch, chemisch und epidemiologisch sehr ähnlich sind (41).

Die Enteroviren gehören zusammen mit den Rhinoviren, dem Enzephalomyokarditisvirus und den Maul- und Klauenseucheviren zur Familie der menschenpathogenen Picornaviren (57).

Mit einem Durchmesser von etwa 28 nm zählen die Coxsackie-Viren zu den kleinsten menschenpathogenen Viren. Sie bestehen aus einer einsträngigen RNA und einem Proteinmantel mit Ikosaederstruktur. Aufgrund des Fehlens einer Lipoidhülle sind sie gegen Äther und Chloroform resistent. Gegenüber Umwelteinflüssen wie Licht, Trockenheit, Temperaturveränderungen, aber auch gegenüber Desinfektionsmitteln sind sie sehr widerstandsfähig. Unter geeigneten Bedingungen bleiben die Coxsackie-Viren bei 4° C mindestens 1 Jahr, bei -20° C über mehrere Jahre vermehrungsfähig (39).

1.2 Epidemiologie der Coxsackie-Viren

Infektionen mit dem Coxsackie-B-Virus kommen auf der ganzen Erde vor. Durchseuchungsstudien zeigen eine

weltweite Verbreitung aller Enteroviren und eine hohe Durchseuchungsrate der Weltbevölkerung bereits im Kindesalter.

Hauptinfektionsquelle für Coxsackievirusinfektionen ist wie für alle Enterovirusinfektionen der Mensch. Insbesondere Kinder im Alter von 1 bis 10 Jahren bilden das Erregerreservoir für Enterovirusinfektionen. Sie vor allem sind für Infektionen empfänglich, da sie noch keine Immunität aufgrund früherer Kontakte mit den Erregern besitzen (20).

Säuglinge infizieren sich zwar insgesamt aufgrund der passiven Immunisierung durch die Mutter selten. Kommt es jedoch kurz vor der Geburt zu einer Infektion in utero, verläuft die Erkrankung des Kindes in den ersten Lebenstagen oft tödlich (34). In solchen Fällen wurde häufig eine Infektion mit Coxsackie-B₄ gefunden (10). Da sich die Coxsackie-Viren vor allem im menschlichen Darmtrakt vermehren, erfolgt die Ausbreitung in erster Linie durch direkten Kontakt auf fäkal-oralem Infektionsweg als Schmierinfektion. Durch pharyngeale Virusausscheidung kann es gelegentlich auch zu einer Tröpfcheninfektion kommen (20). Die Häufigkeit der Enterovirusinfektionen in einem Gebiet hängt ab von der Höhe der mittleren Jahrestemperatur. Bei uns treten Enteroviruserkrankungen hauptsächlich in der warmen Jahreszeit, v. a. im Spätsommer, auf (20).

Die Infektiosität der Coxsackie-Viren ist sehr hoch. So fand man bei Coxsackieinfektionen in Familien, daß drei Viertel der Familienmitglieder ohne Immunität sich nach kurzer Zeit infiziert hatten (37). Die meisten Coxsackieinfektionen verlaufen jedoch subklinisch, d. h. die Kontagiosität ist gering. Die Angaben über die Häufigkeit eines inapparenten Verlaufs einer Infektion schwanken zwischen 50 und nahezu 100 Prozent (37, 42). Diese hohe Rate klinisch nicht manifester Infektionen, sowie sehr häufiges Vorkommen und Ausscheiden der Viren über Wochen, erschwert die Beurteilung der klinischen Relevanz von Coxsackieinfektionen (28). Unterschiede in der Anfälligkeit des Menschen für Coxsackieinfektionen bezüglich Rasse, Geschlecht oder sozialer Bevölkerungsschicht wurden bisher nicht gefunden (20).

Mehrfachinfektionen durch Enteroviren können beim Menschen auftreten, so wurden bei einem Individuum gleichzeitig Coxsackie A- und B-Viren isoliert (1). Wie weit sich die verschiedenen Viren dabei gegenseitig beeinflussen, kann nicht sicher gesagt werden. So konnte man bei Infektionen mit verschiedenen Coxsackietypen keine Wechselwirkungen nachweisen (20).

1.3 Erkrankungen des Menschen bei Coxsackie-B- Infektionen

1.3.1 Allgemeines

Zahlreiche Studien haben gezeigt, daß die Krankheitsbilder bei einer Infektion mit Coxsackie-B-Viren sehr vielfältig sind (8, 33, 10, 51). Es ist oft schwierig, den Zusammenhang zwischen einer Erkrankung und einer Coxsackie-B-Virusinfektion zu beweisen, da oft die Virusisolierung aus dem Stuhl oder Liquor des Patienten oder der Nachweis spezifischer Antikörper im Serum nicht ausreichend sicher gelingt oder ein festgestellter Antikörpertiter wegen beachtlicher Durchseuchungsquoten (36) durchaus schon vor der akuten Erkrankung bestanden haben kann. Ein weiteres Problem in der Diagnosestellung ergibt sich daraus, daß viele Coxsackieinfektionen, wie bereits erwähnt, inapparent verlaufen oder sehr unspezifische Symptome hervorrufen. Einerseits können verschiedene Virustypen gleiche Symptome verursachen, andererseits kann ein Virustyp sehr unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen (20).

Aufgrund der neurotrophen und myotropen Eigenschaften der Coxsackie-B-Viren sind im Falle einer manifesten Infektion in erster Linie das Nervensystem und das Muskelgewebe betroffen (20, 24). Eine Reihe von Studien zeigen, daß die Coxsackie-B-Virusinfektionen vor allem bei verschiedenen Herzerkrankungen wie Perikarditis,

Myokarditis, der kongestiven Kardiomyopathie und unter Umständen dem Herzinfarkt, bei der Bornholm'schen Erkrankung (plötzlich beginnende, fieberhafte Erkrankung mit schweren, oft intermittierenden Schmerzen im Epigastrium und im unteren Thorax, Kopfschmerzen, Halsschmerzen, gelegentlich Muskelschwellung und Myalgien von Stamm und Extremitäten) und bei verschiedenen ZNS-Erkrankungen wie Poliomyelitis-ähnlichen Krankheitsbildern, aseptischer Meningitis und Enzephalitis vorkommen. Dabei ergaben sich für Kinder und Erwachsene unterschiedliche Häufigkeiten der klinischen Manifestationen einer Cocksackie-B-Infektion. So tritt die Bornholm'sche Erkrankung vermehrt bei Erwachsenen auf, während gastrointestinale Beschwerden und aseptische Meningitis häufiger bei Kindern vorkommen (20, 13).

1.3.2 Herzerkrankungen und Morbus Bornholm

Eine Vielzahl von Studien beschäftigt sich mit dem Zusammenhang von Perikarditis, Myokarditis, der kongestiven Kardiomyopathie, dem Herzinfarkt und der Bornholm'schen Erkrankung mit Cocksackie-B-Infektionen.

Schmidt et al. (49) fanden in einer Gruppe von 259 Patienten mit der klinischen Diagnose Perikarditis, Myokarditis oder Bornholm'sche Krankheit bei 70 Patienten

(27%) IgM-Antikörper gegen Coxsackie-B-Viren, d. h. Antikörper, die nach Beginn einer Infektion nur für einige Wochen im Serum des Patienten zu finden sind, in einer Kontrollgruppe mit der gleichen Anzahl von Patienten nur bei 21 (8%). Dabei wurden die Antikörper gegen Coxsackie-B₁, B₃, B₄, B₅ und B₆ mit einem Immundiffusionstest, die Antikörper gegen Coxsackie-B₂ durch Reduktion der Antikörper mit 2-Mercapto-Äthanol nachgewiesen. Grist und Bell (25) diagnostizierten bei einem Kollektiv von 385 Patienten mit verschiedenen Herzerkrankungen und 26 Patienten mit Bornholm'scher Erkrankung bei 33% der Myokarditispatienten, 13% der Perikarditispatienten und 42% der Bornholm-Patienten mit Hilfe eines Neutralisationstests eine kürzlich abgelaufene oder noch floride Coxsackie-Virus-B-Infektion. Es wurde von jedem Patienten je ein Serumpaar aus der akuten Erkrankungsphase und der Rekonvaleszenzphase untersucht, wobei NT-Titer ≥ 512 , signifikant (d. h. 4-fach oder höher) steigende oder fallende Titer oder signifikant steigende Titer bei gleichzeitigem Virusnachweis als Kriterien einer Infektion dienten (2). Ähnliche Häufigkeiten geben auch El Hagrassy et al. (18) an. Sie fanden bei 24 von 64 Patienten (37,5%) mit akuter Perikarditis, bei 14 von 38 Patienten (36%) mit akuter Myokarditis und bei 21 von 57 Patienten (36,8%) mit Bornholm'scher Erkrankung Coxsackie-B-Viren-spezifische IgM-Antikörper. Für Kibrick (33) besteht ebenfalls kein Zweifel, daß die Bornholm'sche Krankheit

durch Cocksackie-B-Viren verursacht wird, da sie oft bei Laborangestellten beobachtet wird, die sich versehentlich mit Cocksackie-B-Viren infiziert haben (52). Außerdem haben eine Reihe von epidemiologischen Studien an verschiedenen Orten einen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Cocksackie-B-Viren und der Bornholm'schen Erkrankung ergeben (12, 13). Auch das mögliche Auftreten von Perikarditis und Myokarditis nach Cocksackie-B-Infektion hält Kibrick (32) für sehr wahrscheinlich. Er berichtet von 6 Kindern und 2 Erwachsenen mit Myokarditis, aus deren Stuhl Cocksackie-B₂, 4 und 5-Viren isoliert wurden, von einem Kind mit Perikarditis und Myokarditis, das Cocksackie-B-Viren im Perikarderguß und im Stuhl hatte, und von 3 Kindern mit akuter tödlicher Myokarditis, bei denen Cocksackie-B-Viren im Myokard bzw. im Lungengewebe und Blut gefunden wurden. Bei einem 10 Monate alten Säugling mit Perikarditis wurden aus dem Perikarderguß Cocksackie-B₃-Viren isoliert. Bei einem achtjährigen Kind, bei dem serologisch eine Cocksackie-B₄-Infektion diagnostiziert war, konnte im Perikarderguß Virus isoliert werden und bei einem 20-jährigen Mann mit der gleichen Erkrankung fand man Cocksackie-B₂-Viren im Perikarderguß und im Stuhl.

Bei der kongestiven Kardiomyopathie wird ebenfalls ein Zusammenhang mit Infektionen durch Cocksackie-B-Viren nicht ausgeschlossen. So fanden El-Hagrassy et al. (18) bei 2 von 28 Patienten (7,1%) mit dieser Erkrankung

spezifische IgM-Antikörper und Cambridge et al. (5) fanden einen Neutralisationstiter von ≥ 1024 bei 15 von 50 Patienten mit kongestiver Kardiomyopathie, dagegen nur bei einer Person in einer gleich großen Kontrollgruppe.

Sehr schwierig zu beurteilen ist die Beteiligung der Coxsackie-B-Viren am Myokardinfarkt. Während Woods et al. (59) und Nicholls und Thomas (44) aufgrund ihrer Ergebnisse (im NT bei Blutproben im Abstand von 14 Tagen 4-facher oder höherer Titeranstieg bei 20 von 233 Patienten, bzw. bei 10 von 38 Patienten mit akutem Myokardinfarkt) an einen Zusammenhang zwischen Coxsackie-Virus-B-Infektion und Infarkt glauben, sehen Wood et al. (58) und Griffiths et al. (23) dafür keine Bestätigung in ihren serologischen Ergebnissen.

Danach hatten bei Wood 7 von 52 Infarktpatienten und 10 von 52 Kontrollpatienten, bei Griffiths 3 von 105 Infarktpatienten und 2 von 99 Kontrollpatienten eine frische Coxsackie-B-Virus-Infektion. Auch Grist und Bell (26) fanden nur bei 15% von 48 Patienten mit Myokardinfarkt Anzeichen einer Coxsackie-B-Virus-Infektion im NT (Titer ≥ 256) und halten daher ebenfalls die Verursachung eines Infarkts durch Coxsackie-B-Viren für eher unwahrscheinlich.

1.3.3 Erkrankungen des ZNS

Unumstritten ist die Beteiligung der Coxsackie-B-Viren an Infektionen des ZNS. Dabei scheint die aseptische Meningitis die häufigste Erkrankung zu sein (20).

Lennette et al. (36) ermittelten in einem Kollektiv von 540 Patienten mit verschiedenen ZNS-Erkrankungen (Polio-myelitis, aseptische Meningitis, Enzephalitis) folgende Ergebnisse: bei 238 Patienten wurde ein Coxsackie-B₁₋₅-Virus isoliert, 50% davon hatten zusätzlich bei Serum-paaren, die im Abstand von einigen Wochen gewonnen wurden, einen signifikanten Titeranstieg (4-fach oder höher) im NT, wobei bei den Typen Coxsackie-B₂, 4 und 5 in etwa gleich viele, bei Coxsackie-B₃ sehr wenige und bei Coxsackie-B₁ überhaupt kein Titeranstieg gefunden wurde. Von den restlichen 302 Patienten ohne Virusnachweis wiesen 33 einen signifikanten Titeranstieg auf. Ebenso gibt Kibrick (32) eine Reihe von Fällen an, in denen bei Patienten mit aseptischer Meningitis im Liquor Coxsackie-B₁₋₅ gefunden wurde, darüberhinaus berichtet er über 2 Patienten mit der gleichen Erkrankung, aus deren Stuhl Coxsackie-B₆ isoliert wurde (27). Es bestehen für ihn auch keine Zweifel, daß die Coxsackie-B-Viren der Polyomyelitis ähnliche klinische Erscheinungsbilder hervorrufen können (33). Kibrick et al. (31) und Sussman (55) berichten über gesicherte Fälle

von Enzephalitis bei Neugeborenen durch Infektion mit Coxsackie-B-Viren.

1.3.4 Andere Erkrankungen

In einer Vielzahl von Studien werden sehr unterschiedliche Symptome und Krankheitsbilder mit Coxsackie-B-Infektionen in Zusammenhang gebracht, wobei oft nur unzureichend nachgewiesen werden kann, daß tatsächlich ein Coxsackie-Virus die Erkrankung verursachte (32).

So werden Hautexantheme beschrieben, teilweise allein oder in Verbindung mit einer aseptischen Meningitis auftretend, die offensichtlich durch Coxsackie-B-Viren ausgelöst worden sind (32).

Ebenfalls diskutiert wird ein Zusammenhang von Orchitis und Coxsackie-B-Infektion, da bei einer Reihe von Patienten im Anschluß an eine Bornholm'sche Erkrankung eine Orchitis auftrat (22, 12). Bei einem jungen Erwachsenen mit akuter Orchitis konnte sogar das Coxsackie-Virus B₅ aus einer Hodenbiopsie isoliert, sowie ein Antikörperanstieg im Serum nachgewiesen werden (9).

Eine Hepatitis wurde bisher nur bei Neugeborenen mit generalisierter Coxsackie-B-Infektion beobachtet (31),

es sind jedoch auch Leberinfektionen bei Kindern jenseits der Neugeborenenperiode beschrieben, die im Rahmen einer Coxsackie-B₅-Infektion auftraten und mit schmerzhafter Lebervergrößerung, Milzvergrößerung, sowie cervicalen und axillären Lymphknotenschwellungen einhergingen (54).

Beim akut einsetzenden juvenilen Diabetes wird gelegentlich ebenfalls eine Coxsackie-B-Infektion als Ursache vermutet. Man nimmt an, daß die Viren B-Zell-Nekrosen in den Langerhans'schen Inseln verursachen (18, 61).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß aufgrund begrenzter diagnostischer Möglichkeiten bei den hier dargestellten Erkrankungen eine Verursachung durch Coxsackie-B-Viren zwar möglich ist, jedoch in den meisten Fällen ein Zusammenhang nicht eindeutig bewiesen werden konnte.

1.4 Methoden zum Nachweis einer Coxsackie-B-Infektion

1.4.1 Virusisolierung

Eine der wichtigsten Methoden, die Diagnose einer Coxsackie-B-Infektion zu stellen, ist der direkte Virusnachweis. Am besten ist das Virus aus Stuhlproben zu isolieren, wo es manchmal noch Monate nach erfolgter

Infektion nachzuweisen ist. Gelegentlich ist auch in den ersten Tagen einer Infektion eine Virusisolierung aus Rachenabstrichen, Liquor oder einzelnen Organen möglich (20, 37). Blut eignet sich nicht zur Virusisolierung, da die kurze Virämiephase den klinischen Symptomen meist um einige Tage vorausgeht (20).

Werden bei einer Organerkrankung aus diesem Organ Coxsackie-B-Viren isoliert, gelten sie als sicherer Nachweis dieser Erkrankung, unter der Voraussetzung, daß keine Kontamination stattgefunden hat (37, 39). Dagegen beweist der Virusnachweis im Stuhl keine akute Infektion, da eine inapparente Coxsackie-B-Virus-Infektion und eine weitere Erkrankung gleichzeitig vorliegen können. Auch wurde tierexperimentell nachgewiesen, daß mit der Nahrung aufgenommene Coxsackie-Viren passiv durch den Magen-Darm-Trakt transportiert werden und aus dem Stuhl isoliert werden können (39).

Wesentlich zuverlässiger kann eine Coxsackie-B-Infektion diagnostiziert werden, wenn der Virusnachweis gelingt und im Neutralisationstest ein signifikanter Anstieg homologer neutralisierender Antikörper auftritt (39, 37).

1.4.2 Serologische Nachweismethoden

1.4.2.1 Neutralisationstest

Mit dem Neutralisationstest ist der typenspezifische Nachweis von Coxsackie-B-Antikörpern möglich (4, 40). Dabei werden die virusneutralisierenden Antikörper quantitativ bestimmt. Standardisierte Virussuspensionen werden mit abnehmenden Serumkonzentrationen gemischt und in eine Gewebekultur gegeben und untersucht, bis zu welcher Serumverdünnung die Antikörper den zytopathischen Effekt (CPE) der Viren verhindern. Als Neutralisationstiter wird die Serumverdünnung bezeichnet, bei der bei der Hälfte der infizierten Zellen kein CPE auftritt. Findet man nun bei einem Patienten in einem Serum aus der Rekonvaleszenzphase einen mindestens 4-fach höheren Titer als in einem Serum aus der Akutphase, gilt dies als Beweis für eine akute Infektion.

Ein Vorteil des Neutralisationstests gegenüber anderen serologischen Testverfahren liegt in der Möglichkeit, einzelne Virustypen zu differenzieren, da die Antikörper sich gegen typenspezifische Oberflächenantigene des Virus richten (4, 40). Während bei einer Erstinfektion mit einem Coxsackie-B-Virus der Virustyp also ohne weiteres bestimmt werden kann, ist dies bei Folgeinfektionen mit Coxsackie-B-Viren oft nicht mehr möglich, da dann oft die von der früheren Infektion noch vorhandenen Antikörper geboostert werden. Die Titer der

heterologen Antikörper können dann schneller steigen und erreichen höhere Werte als die der homologen (36).

Eine weitere Schwierigkeit beim Neutralisationstest ergibt sich aus dem rasch ansteigenden Antikörpertiter beim Auftreten einer Infektion. Um einen signifikanten Titeranstieg nachzuweisen, benötigt man eine Serumprobe möglichst aus den ersten Tagen nach erfolgter Infektion (36, 45). Diese liegt jedoch oft nicht vor, da klinische Symptome manchmal spät auftreten und der Antikörperanstieg bereits erfolgt ist (36, 49).

1.4.2.2 Komplementbindungsreaktionen, Hämagglutinationshemmtest, Immunfluoreszenz, Gel-Doppel-Diffusion und Counterimmuno-electrophorese

Eine Reihe von Testverfahren, mit denen versucht wurde, Coxsackie-B-Infektionen nachzuweisen, konnte sich nicht in größerem Umfang durchsetzen, da die Ergebnisse zu wenig zuverlässig sind.

So kann mit der Komplementbindungsreaktion kaum der Virustyp bei einer Erkrankung bestimmt werden, da häufig Titeranstiege heterologer Virustypen beobachtet worden sind (39).

Ebenfalls wenig geeignet zum Nachweis von Coxsackie-B-Antigenen sind der Hämagglutinationshemmtest (47) und Immunfluoreszenzmethoden (53).

Im Gel-Doppel-Diffusions-Test wurden präzipitierende Antikörper gegen Coxsackie-Viren B₁, B₃, B₄, B₅, bisweilen B₆, nicht jedoch B₂ nachgewiesen, die bereits in der Rekonvaleszenzphase der Erkrankung wieder aus dem Serum verschwanden (48).

Eine weitere Möglichkeit, eine akute Coxsackie-B-Infektion zu diagnostizieren, ist der Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern, die zu Beginn einer Infektion auftreten und im Allgemeinen nach einigen Wochen wieder aus dem Serum verschwunden sind.

Mit einem Immundiffusionstest konnten Schmidt et al. in Patientenserum IgM-Antikörper gegen Coxsackie-Virus B₁, B₃, B₄, B₅ und B₆ nachweisen. Bei Coxsackie-B₂ konnten IgM- und IgG-Antikörper nicht differenziert werden (49).

Minor et al. stellten mit einem Counterimmunoelectrophoresetest bei 19 von 22 Patienten mit nachgewiesener Coxsackie-B₁, 3, 4 oder 5-Infektion IgM-Antikörper fest, wobei sie auch den Virustyp differenzierten. Schwierigkeiten ergaben sich auch bei diesem Test mit Coxsackie-B₂: von 7 Seren von Patienten mit durch Virusisolierung bewiesener Infektion reagierten nur 2 positiv. In 3 von

72 Kontrollseren von Patienten mit anderen Virusinfektionen traten gegen Coxsackie-B-Viren spezifische IgM-Antikörper auf (43).

1.4.2.3 Elisa-Teste (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Mit dem Elisa-Test können IgG- und IgM-Antikörper im Serum nachgewiesen werden (19, 56). Zur Diagnostik einer akuten oder vor kurzem abgelaufenen Infektion bei Hepatitis A (17), Hepatitis B (21), Cytomegalie (50), Röteln (35) und Frühsommermeningoenzephalitis (46) werden bereits routinemäßig Elisa-Tests eingesetzt.

Der Elisa zum Nachweis von Antikörpern gegen Coxsackie-B wurde ursprünglich mit dem Antigen in der Festphase durchgeführt (56). Dörries et al. geben einen Radioimmunoassay zum Nachweis enterovirusspezifischer IgG- und IgM-Antikörper mit dem Antigen in der Festphase an, mit dem auch das infektiösauslösende Virus typisiert werden kann (15).

Die gleichen Autoren wiesen auch IgM-Antikörper gegen Coxsackie-B-Viren mit einem Elisa-Test nach (16). Dabei kommen sie zu dem Ergebnis, daß bei Nachweis von IgM-Antikörpern zwar eine Coxsackie-B-Infektion vorliegt, jedoch nicht der vorliegende Virustyp bestimmt werden

kann. Man erklärt sich diese Kreuzreaktionen, die jedoch auf die Coxsackie-B-Gruppe beschränkt sind, durch gruppenspezifische Antigene der verschiedenen Coxsackie-B-Serotypen. Die Virustypisierung im Elisa-Test gelingt am ehesten dann, wenn die im Test verwandten Viruspartikel möglichst unbeschädigt sind (16, 29).

Seit einigen Jahren wird eine Testanordnung mit Anti- μ in der Festphase verwendet. Der Test läuft nach folgendem Prinzip ab: auf eine Mikrotiterplatte wird Anti- μ (ein spezifischer Antikörper gegen die schweren Ketten (μ -Ketten) des IgM-Moleküls) aufgetragen. Gibt man Patientenserum dazu, bildet das Anti- μ mit dem im Serum vorhandenen IgM einen Antigen-Antikörper-Komplex. Wird nun Virus aufgetragen, reagiert es mit dem IgM, falls spezifische IgM-Antikörper im Serum gegen dieses Virus vorhanden sind. In einem weiteren Schritt läßt man Peroxidase-gekoppeltes, gegen den jeweiligen Coxsackie-B-Typ spezifisches IgG mit dem gebundenen Virus reagieren.

Durch die Zugabe von Substrat erhält man eine Farbreaktion, die in ihrer Intensität abhängig ist von der Menge gebundener Peroxidase und somit letztendlich von der Menge der spezifischen IgM-Antikörper im Patientenserum.

El Hagrassy et al. benützten einen Elisa nach dem anti- μ -Prinzip zum Nachweis spezifischer IgM-Antikörper gegen

Coxsackie-B-Viren mit gepoolter Coxsackie-Virus-Suspension B₁₋₅ (18).

Yolken beschreibt einen Elisa-Test, mit dem er Coxsackie-B-Virus in Zellkulturen und klinischem Probenmaterial wie z. B. Stuhl nachwies und die Virustypen identifizierte (60). Während die Ergebnisse bei Zellkulturen sehr zuverlässig waren, traten beim Virusnachweis in Stuhlproben oft unspezifische Reaktionen und gelegentlich falsch negative Ergebnisse auf. Katze wies mit einem Elisa-Test homologe Antikörper gegen Coxsackie-B-Viren in Hyperimmunseren von Kaninchen nach (30).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war, einen Elisa zum Nachweis von typenspezifischen IgM-Antikörpern gegen Coxsackie-B-Viren zu entwickeln. Dazu wurde die Testanordnung mit Anti- μ in der Festphase benutzt. Der Test wurde in der vorliegenden Arbeit für die Coxsackietypen B₁, B₄, B₅ und B₆ ausgearbeitet. Die Entwicklung dieses Tests für die Coxsackietypen B₂ und B₃ wurde bereits in einer früheren Arbeit behandelt (3). Es wurden Coxsackie-B-Virus-suspensionen gereinigt und damit Kaninchen immunisiert. Aus den Immunseren der Kaninchen wurden spezi-

fische IgG-Antikörper gegen Coxsackie-B-Virus Typ 1, 4, 5 und 6 gewonnen und mit Peroxidase (HRPO) gekoppelt.

Es wurden Seren von Patienten mit klinischen Symptomen einer Coxsackie-B-Infektion mit und ohne Virusisolierung getestet. Die Empfindlichkeit des Tests, die Persistenz von IgM-Antikörpern im Serum, Kreuzreaktionen von Seren mit verschiedenen Virusinfektionen im Test, sowie die Zuverlässigkeit des Tests bezüglich falsch positiver und negativer Ergebnisse wurde untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Seren

Es wurden 1354 Seren von Patienten mit klinischen Symptomen einer Coxsackie-B-Infektion getestet. Die Seren waren aus Krankenhäusern des gesamten bayerischen Raumes an das Max-von-Pettenkofer-Institut zur Diagnostik eingesandt worden. Außerdem wurden 61 Serumpaare von Patienten getestet, bei denen Dr. K.W. Knocke vom Staatl. Medizinaluntersuchungsamt Hannover Coxsackie- oder Echo-Viren isoliert oder serologisch eine Mumpsinfektion nachgewiesen hatte. Diese Seren wurden von Dr. K.W. Knocke zur Verfügung gestellt. Aus 9 Seren war ein Echo-9, aus 14 Seren ein Echo-11, aus 2 Seren ein Echo-25, aus 2 Seren ein Coxsackie-B₁, aus 2 Seren ein Coxsackie-B₂, aus 5 Seren ein Coxsackie-B₃, aus 7 Seren ein Coxsackie-B₄ und aus 1 Serum ein Coxsackie-B₅ isoliert worden. 19 Seren hatten in der serologischen Testung für Mumps einen signifikanten Titeranstieg.

2.2 Herstellung der Reagenzien für den Elisa

Zur Entwicklung eines Elisa-Tests, mit dem menschliche Seren auf eine Coxsackie-B-Infektion hin getestet werden können, mußten gereinigte Antigene, durch Immunisierung

von Kaninchen gewonnene Antiseren, sowie mit Peroxidase gekoppelte Antiseren hergestellt werden.

2.2.1 Viruszüchtung

Zur Virusvermehrung wurden für jeden Coxsackie-B-Typ ungefähr 20 Roux-Flaschen mit Rita-Zellkulturen nach mikroskopischer Kontrolle auf gleichmäßiges und dichtes Zellwachstum hin und mehrmaligem Waschen mit PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,2), dem eine Ampulle Penicillin-Streptomycin (1,5 Mio. IE Penicillin + 0,15 g Streptomycin pro 500 ml) zugesetzt war, mit je 5 - 7 ml Virussuspension (ID 50 im NT $10^{2,5}$ - $10^{5,3}$) infiziert. Dann wurde die auf 12 ml ergänzende Menge an Medium 199 (Erhaltungsmedium) dazupipettiert, das mit 8,4 ml Bicarbonat (5%), 10 ml inaktiviertem fötalem Kälberserum und 1 Ampulle Penicillin-Streptomycin pro 500 ml versetzt und im Wasserbad auf 37° C angewärmt war. Zwei Roux-Flaschen wurden zur Herstellung von radioaktiv markiertem Virus zusätzlich mit 0,5 ml ^3H -Uridin versetzt (Aktivität: 1 mCurie/ml).

Nach einstündiger Adsorption wurde mit Medium 199 auf 50 ml aufgefüllt und für 12-24 Stunden bei 37° C inkubiert.

Nach Ablesung des zytopathischen Effekts (CPE) unter dem Mikroskop wurden die Zellkulturen dreimal eingefroren und aufgetaut und die Zelltrümmer bei 3000 Upm in 30 Minuten abzentrifugiert.

Das Virus wurde nach Zugabe von 0,4 M NaCl und 100 g Polyäthylenglykol (PEG 6000, Serva, Heidelberg) pro Liter unter ständigem Rühren für 12-24 Stunden bei 4° C präzipitiert und 45 Minuten mit 8000 Upm zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 50-60 ml Tris/NaCl-Puffer (50 mM Tris pH 7,4 + 0,05 n NaCl) resuspendiert, mit der gleichen Menge Freon (Trichlortrifluoräthan) versetzt, bei Zimmertemperatur etwa 15 Minuten heftig gerührt und anschließend durch 30-minütige Zentrifugation mit 3000 Upm extrahiert. Nach Abheben der wäßrigen Phase wurde nun die Zwischenphase durch Zugabe von weiteren 15-20 ml Tris/NaCl-Puffer ausgeschüttelt. Beide Überstände wurden vereint, mit N-Lauroylsarkosin 0,5% (SLS) versetzt und bei 37° C 10 Minuten inkubiert.

2.2.2 Virusreinigung

Je 16 ml des Viruspellets wurden auf einen CsCl-Stufengradienten aufgetragen und bei 4° C 16 Stunden mit

25000 Upm zentrifugiert (Rotor: Beckman SW 27, Zentrifuge Contron). Die einzelnen Lösungen des Gradienten wurden in Tris-Puffer (50 mM pH 7,4) hergestellt, der mit SLS (0,1%) versetzt war, und folgendermaßen in Polylallomer-Röhrchen geschichtet:

5 ml CsCl	1,5 g/ml
4 ml CsCl	1,37 g/ml
4 ml CsCl	1,3 g/ml
4 ml Saccharose 30%	

Um feststellen zu können, in welcher Fraktion sich das Virus konzentriert, wurde jedem Gradienten eine geringe Menge radioaktiv markierter Viren zugesetzt.

Die Gradienten wurden ausgetropft und in ca. 50 Fraktionen von etwa 0,5 ml in silikonisierten Eppendorfröhrchen gesammelt. Von jeder Fraktion wurden von 10 µl (in 2 ml Szintillationsflüssigkeit) im Counter (Kontron, Liquid Scintillation Counter MR 300) die CPM gemessen und die Peakfraktion bestimmt.

Die so ermittelten 4-6 virushaltigen Peak-Fraktionen pro Gradient wurden gepoolt, für 12-24 Stunden gegen Tris-Puffer (0,1 M pH 7,4) dialysiert und bei -20° C tiefgefroren.

2.2.3 Bestimmung der Konzentration im infektiösen Virus

Die Virus-Konzentrations-Bestimmung erfolgte nach einer Endverdünnungsmethode, bei der die Virussuspension in geometrischer Reihe verdünnt wird und die Endverdünnung bestimmt wird, bei der noch eine oder mehrere Infektionseinheiten Virus vorhanden sind (4). Dazu wurde nach Verdünnung des Virus mit Medium (MEM + 1 Amp. Penicillin-Streptomycin/500 ml + 8,4 ml Na-Bicarbonat/ 500 ml) in einer Reihe von 1:10 bis 1:10¹⁰ auf einer Mikrotiterplatte in einem Vierfachansatz pro Napf 25 µl Medium, darauf 25 µl des verdünnten Antigens (4 Näpfe für jede Verdünnungsstufe) und darauf schließlich 25 µl Zellsuspension aufgetropft. Die Platte wurde mit einer Klarsichtfolie luftdicht verschlossen und bei 37° C im CO₂-Schränk inkubiert. Nach 7-8 Tagen wurde unter dem Mikroskop abgelesen, bis zu welcher Verdünnungsstufe das Virus einen CPE erzeugt hatte.

2.2.4 Herstellung der Antiseren

Zur Gewinnung von Antiseren gegen die einzelnen Stämme des Coxsackie-B-Virus wurden weibliche Kaninchen durch subkutane Injektion von 1 ml gereinigtem Virus der Coxsackie-B₁, 4, 5, 6, gemischt mit der gleichen Menge kom-

plettes Freund'sches Adjuvans, immunisiert. 10-14 Tage später erfolgte eine intravenöse Boosterung mit etwa 0,5 ml Virus. Wiederum nach etwa 14 Tagen wurden durch eine Herzpunktion 20 ml Blut entnommen. 10-20 Tage vor dem Entbluten des Tieres wurde schließlich nochmals mit etwa 1 ml Virus i.v. geboostert.

Immunisierungsschema

Zeit	Antigen	Blutabnahme
0	0,7 - 1,0 ml s.c.	2 ml
2 Wochen	0,5 - 0,8 ml i.v.	
4 Wochen		20 ml
12 Wochen	0,7 - 1,0 ml i.v.	
14 Wochen		ausgeblutet (100-120 ml)

2.2.5 IgG-Präparation

Das Kaninchenserum wurde 1 : 2 mit Aqua dest. verdünnt und die Immunglobuline durch die Zugabe von 45%iger Ammoniumsulfatlösung pH 7,2 gefällt und abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde in NaCl-Tris-Puffer pH 8 (0,02 M

Tris + 0,028 M NaCl + 0,02% NaN_3) aufgelöst (80 ml Puffer/ 100 ml Serum) und über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert.

Zur Entfernung der noch vorhandenen Aggregate wurde diese IgG-Präparation 10 Minuten mit 10000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine DEAE-Affi-Gel-Blue-Säule (Größe 2,4 x 35 cm, Bio-Rad-Laboratories, Richmond, USA) aufgetragen, die mit NaCl-Tris-Puffer pH 8 (Zusammensetzung siehe oben) gewaschen worden war. Das Eluat aus der Säule wurde in Fraktionen von 5 ml gesammelt und der Proteingehalt im Photometer bei 280 nm gemessen. Die IgG-haltigen Fraktionen wurden gepoolt und mit einer Amiconkammer auf eine Endkonzentration von ungefähr 7-8 mg Protein/ml eingengt, mit NaCl versetzt (Endkonzentration 0,9%) und bei -20°C eingefroren.

2.2.6 Antikörper-Titer-Bestimmung der Antiseren

Die Titer der IgG-Präparationen aus den Kaninchenseren wurden im Neutralisationstest (NT) bestimmt (4). Dabei wurde eine Serumverdünnungsreihe mit einer konstanten Virusmenge inkubiert und auf Zellkulturen aufgebracht. Nach 7 Tagen wurde der an den Zellen aufgetretene CPE unter dem Mikroskop überprüft.

2.2.7 Peroxidase-Kopplung

4 mg Peroxidase (Sigma) wurden in 1 ml Aqua dest. aufgelöst, mit 0,2 ml 0,1 M Na-Perjodat (0,214 g/10 ml) versetzt und 20 Minuten geschüttelt, um Aldehydgruppen für die spätere Kopplung mit den primären Aminogruppen des IgG zu bilden. Diese Lösung wurde über Nacht gegen Acetatpuffer (1 mM pH 4,4) dialysiert. Parallel dazu erfolgte die Dialyse von 1 ml Immunglobulinpräparation (7-8 mg IgG/ml) gegen Carbonatpuffer (0,01 M pH 9,5).

Nach der Dialyse wurde die aktivierte Peroxidase mit 20 µl Carbonatpuffer (0,2 M pH 9,5) auf dessen pH eingestellt und sofort anschließend mit der Immunglobulinpräparation vereinigt und 2 Stunden geschüttelt. Durch Zugabe von 0,1 ml Borhydrid (4 mg/ml) wurde die Reaktion beendet und das Reaktionsgemisch auf eine Sephacryl S-200-Säule (Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Das Eluat wurde in Fraktionen von etwa 3 ml gesammelt, deren Protein- bzw. Peroxidase-Gehalt photometrisch bei 280 bzw. 403 nm bestimmt wurden. Der Wert der O. D. des Peroxidasegehaltes wurde durch den Wert der O. D. des Proteingehaltes dividiert und die Fraktionen, deren Quotient ein optimales Verhältnis von 0,3 bis 0,6 aufwiesen, gepoolt und auf 6 ml eingeeengt. Nach Zugabe von Rinderalbumin (10 mg/ml) wurden sie in Portionen á 60 µl bei -20° C tiefgefroren.

2.2.8 Bestimmung der Antigenkonzentration im Sandwich-Test

Zur Bestimmung der Antigenkonzentration wurde je eine Flachboden-Mikrotiterplatte (Immulon Dynatech, Alexandria, USA) mit der IgG-Präparation gegen Coxsackie-B₁, 4, 5, 6 in den Verdünnungen 1 : 100 und 1 : 1000 in Carbonatpuffer (pH 9,4) beschichtet (50 µl/Napf; Inkubation für 12 Stunden bei 4° C). Nach dreimaligem Waschen der Platte mit PBS, das 0,05% Tween enthält, wurden 50 µl Antigen in den Verdünnungen von 1 : 10, 1 : 40, 1 : 160, 1 : 640, 1 : 2560 aufgetragen und die Platte wiederum für 12 Stunden bei 4° C inkubiert. Nach abermaligem Waschen wurden 50 µl spezifisches HRP0-IgG in den Verdünnungen 1 : 100 und 1 : 1000 in PBS aufgetropft, die Platte für 2 Stunden bei 37° C inkubiert, wieder gewaschen und 100 µl Substrat (Orthophenylendiamin 1 mg/ml Phosphatpuffer pH 6,0 + H₂O₂ (Perhydrol) 1 µl/ml) aufgetragen. Nach 15 Minuten wurde die Enzymreaktion mit 100 µl 2 M H₂SO₄ abgestoppt und mittels 8-Kanal-Photometer bei 510 nm die optische Dichte bestimmt.

2.2.9 Durchführung des Elisa zum Nachweis von Coxsackie-B-IgM-Antikörpern

Flachboden-Mikrotiterplatten wurden mit Anti- μ (Dako Immunglobulin, Kopenhagen, Dänemark), 1 : 1000 mit Carbonatpuffer pH 9,4 verdünnt, beschichtet (50 μ l/Napf) und über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Platte mit PBS-Tween wurden die zu testenden Patientenseren, sowie ein negatives Kontrollserum (je 50 μ l) in die Näpfe eingebracht (Verdünnung von 1 : 100 in PBS mit 3% Tween und 2% Schafserum), für 2 Stunden bei 37° C inkubiert und wieder gewaschen, 50 μ l Antigen (Coxsackie-B₁, 4, 5, 6) zugegeben und die Platte über Nacht bei 4° C kühlgestellt. Nach abermaligem Waschen wurden 50 μ l Konjugat (HRPO-anti-B₁, 4, 5, 6-IgG; 1 : 100 in PBS mit 2% Schafserum) aufgetragen, 2 Stunden bei 37° C inkubiert, nochmals gewaschen und 100 μ l Substrat (Orthophenylendiamin 1 mg/ml Phosphatpuffer + Perhydrol 1 μ l/ml) aufgetropft. Nach 20 Minuten wurde die Enzymreaktion mit 100 μ l 2 M Schwefelsäure abgestoppt und im 8-Kanal-Photometer die optische Dichte jeder Reaktion bei 510 nm bestimmt. Eine Reaktion wurde als positiv betrachtet, wenn der Quotient aus dem Wert der optischen Dichte des Patientenserums und dem Wert der optischen Dichte des negativen Kontrollserums über 2,1 lag.

3. Ergebnisse

3.1 Virus-Präparation

Abb. 1 zeigt am Beispiel Coxsackie-B₄ das Ergebnis der Virusreinigung nach der Zentrifugation des mit ³H-Uridin markierten und mit Freon extrahierten Virus in einem CsCl-Saccharose-Gradienten. In den Fraktionen 27 - 29 ist ein Peak mit 12000 CPM, d. h. in diesen Fraktionen ist die höchste Viruspartikelkonzentration. Sie wurden gepoolt und zur Immunisierung der Kaninchen verwandt. Bei einer Ausgangsmenge von 1 Liter Gewebekulturüberstand erhielt man so etwa 4 - 6 ml gereinigtes Antigen. Mit dieser Methode wurde gereinigtes Antigen von Coxsackie-B₁, B₄, B₅ und B₆ hergestellt. Bei allen 4 Typen waren die Ergebnisse ähnlich, sie sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Die linke Spalte zeigt die Titer der bei den Viruspräparationen verwendeten Ausgangsmaterialien, die rechte die Titer der im CsCl-Dichtegradienten gereinigten Viren. Man sieht, daß die Viruskonzentrationen bei der Reinigung um 1 - 2 Zehnerpotenzen erhöht wurden, so stieg der Titer bei Coxsackie-B₁ von 10^{5.8} pro ml auf 10^{6.9} pro ml, bei Coxsackie-B₄ von 10^{6.1} auf 10^{7.9}, bei Coxsackie-B₅ von 10^{6.1} auf 10^{6.9} bzw. von 10^{6.9} auf 10^{8.1} und bei Coxsackie-B₆ von 10^{4.1} auf 10^{6.1} bzw. von 10^{5.3} auf 10^{7.1}.



Abb.1 Virusreinigung für den Coxsackietyp B₄ (mit ³H-Uridin markiert)

Tabelle 1

Bestimmung der Titer der für die Viruspräparationen verwendeten Ausgangsmaterialien und der im CsCl-Dichtegradienten gereinigten Viruspräparationen

STAMM	AUSGANGSMATERIAL	GEREINIGTES VIRUS
B ₁	$10^{5.8}$ pro ml	$10^{6.9}$ pro ml
B ₄	$10^{6.1}$	$10^{7.9}$
B ₅	1. Präparation: $10^{6.1}$	$10^{6.9}$
	2. Präparation: $10^{6.9}$	$10^{8.1}$
B ₆	1. Präparation: $10^{4.1}$	$10^{6.1}$
	2. Präparation: $10^{5.3}$	$10^{7.1}$

3.2 IgG-Präparation

Für eine IgG-Präparation wurden jeweils 10 ml Kaninchenserum, die 2 Wochen nach der 2. Immunisierung der Tiere gewonnen worden waren, benötigt. Die Immunglobuline wurden in Ammoniumsulfatlösung gefällt und in einer Deae-Affi-Gel-Blue-Säule gereinigt. Das IgG-haltige Eluat aus der Säule, das 50 - 60 ml betrug, wurde in einer Amiconkammer auf 9 - 10 ml eingeengt und hatte dann einen Proteingehalt von 7 - 8 mg/ml. Tab. 2 enthält die im NT bestimmten Titer der Kaninchenseren vor und nach Immunisierung, sowie die Titer und den Proteingehalt der IgG-Präparationen. Es zeigt sich ein hoher Titerabfall zwischen den Neutralisationstitern der Seren und den Titern der IgG-Präparationen nach der Chromatographie in der Deae-Affi-Gel-Blue-Säule. So entspricht bei Coxsackie-B₁ der Abfall von 1 : 4 Mill. im Serum auf 1 : 130000 in der IgG-Präparation einem Verlust von ca. 95%, der Abfall von 1 : 4 Mill. auf 1 : 500000 bei Coxsackie-B₄ einem Verlust von ca. 85% und der Abfall von 1 : 25000 auf 1 : 64000 bei Coxsackie-B₅ einem Verlust von ca. 75%. Serum und IgG-Präparation von Coxsackie-B₆ wurden nicht getestet.

Tabelle 2

Bestimmung der Neutralisationstiter der Kaninchenserum vor und nach Immunisierung mit Cox B₁, 4, 5, 6. In der letzten Spalte ist der Proteingehalt der IgG-Präparation angegeben.

Stamm	Präserum	Serum nach Immun.	IgG-Präp.	mg IgG/ml
B ₁	negativ	1 : 4 Mill.	1 : 130000	7,9
B ₄	1 : 8	1 : 4 Mill.	1 : 500000	7,0
B ₅	negativ	1 : 250000	1 : 64000	8,9
B ₆	not tested	not tested	not tested	7,8

3.3 Peroxidase-Kopplung

Es wurden jeweils 4 mg Peroxidase mit 7,5 - 8,5 mg IgG gekoppelt. Abb. 2 zeigt das Elutionsprofil des Reaktionsgemisches nach Kopplung am Beispiel Cocksackie-B₄. Es wurde nahezu die gesamte Peroxidase gebunden. Für jede Fraktion wurde die optische Dichte bestimmt und der Quotient aus optischer Dichte bei 403 nm (Peroxidase-Absorptionsmaximum) und optischer Dichte bei 280 nm (Protein-Absorptionsmaximum) gebildet. In den Fraktionen 16 - 18 ergab sich ein optimales Verhältnis von IgG und Peroxidase, sie wurden zur weiteren Verwendung im Elisa-Test gepoolt, in dem das gekoppelte IgG in der Verdünnung 1 : 100 benötigt wurde.

3.4 Bestimmung der optimalen Antigenkonzentrationen für den Elisa zum Nachweis von Cocksackie-B-IgM-Antikörpern

Um die optimalen Antigenkonzentrationen für den Elisa-Test zu ermitteln, wurden Antigentitrationen (1 : 5 bis 1 : 2560) für Cocksackie-B₁, 4, 5, 6 in einem Sandwich-Test mit dem entsprechenden spezifischen IgG-Antikörper an der Festphase und dem entsprechenden peroxidasegekoppelten Antikörper durchgeführt. Die Abbildungen 3 und 4 zeigen die Abhängigkeit der bei der enzymatischen

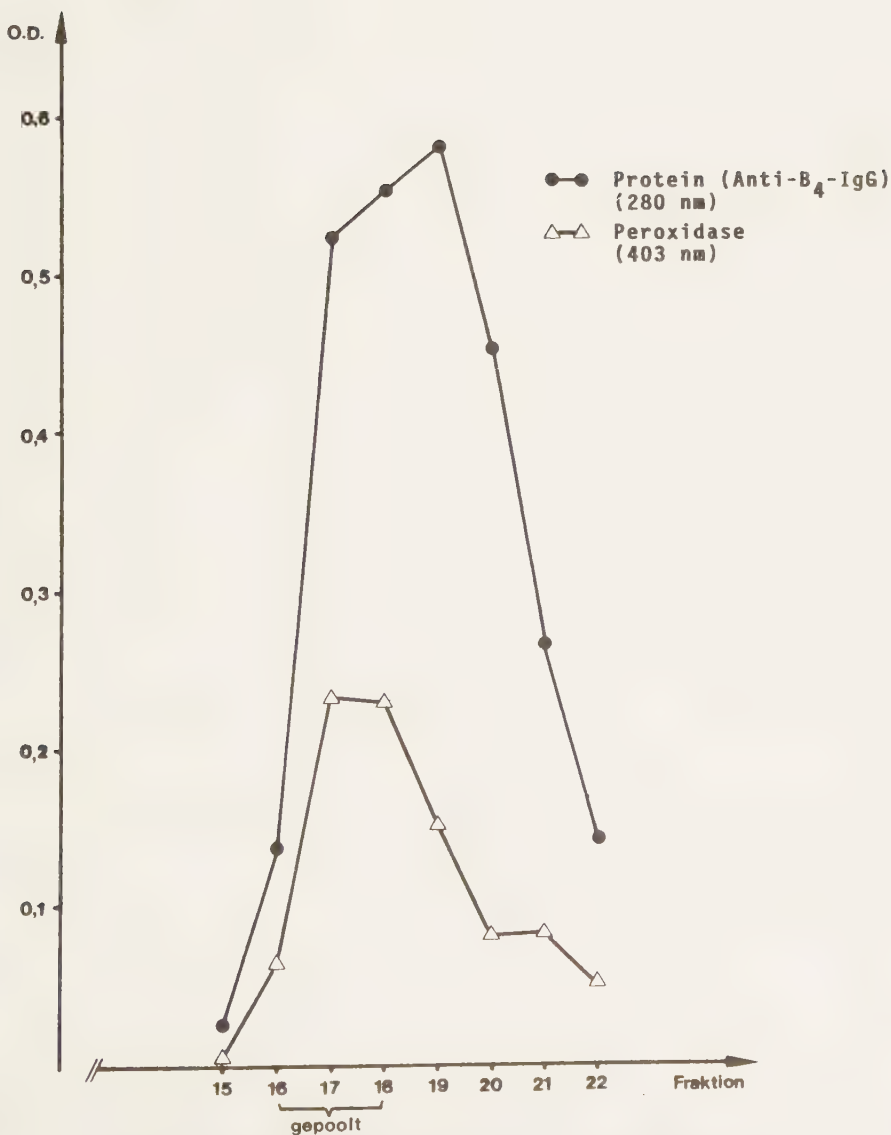


Abb.2 Elutionsdiagramm des IgG-Peroxidasekomplexes nach der Kopplung von Anti-Coxsackie-B₄-IgG mit Peroxidase

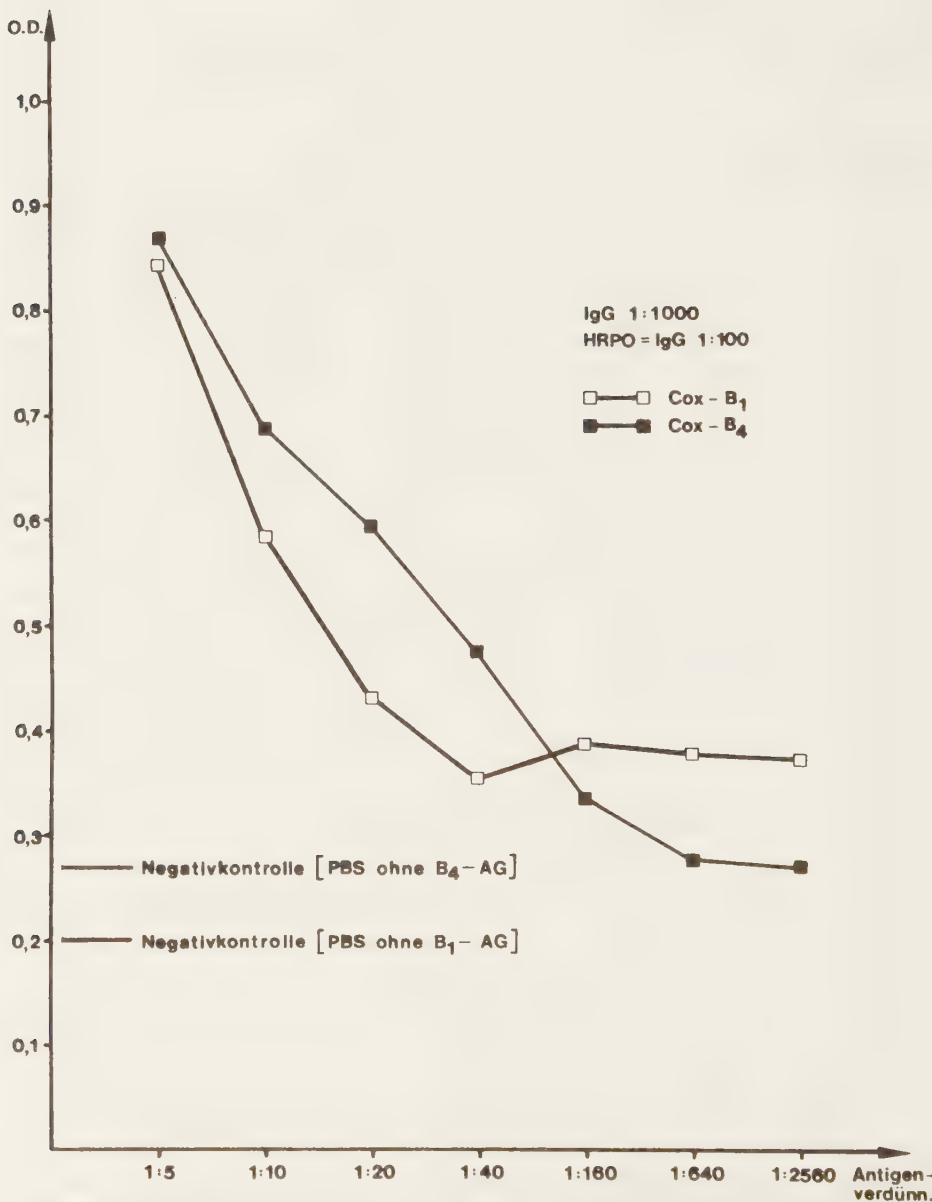


Abb.3 Antigen titration zur Bestimmung der optimalen Antigenkonzentration im Elisa mit dem Sandwich-Test für Coxsackie B₁ und B₄

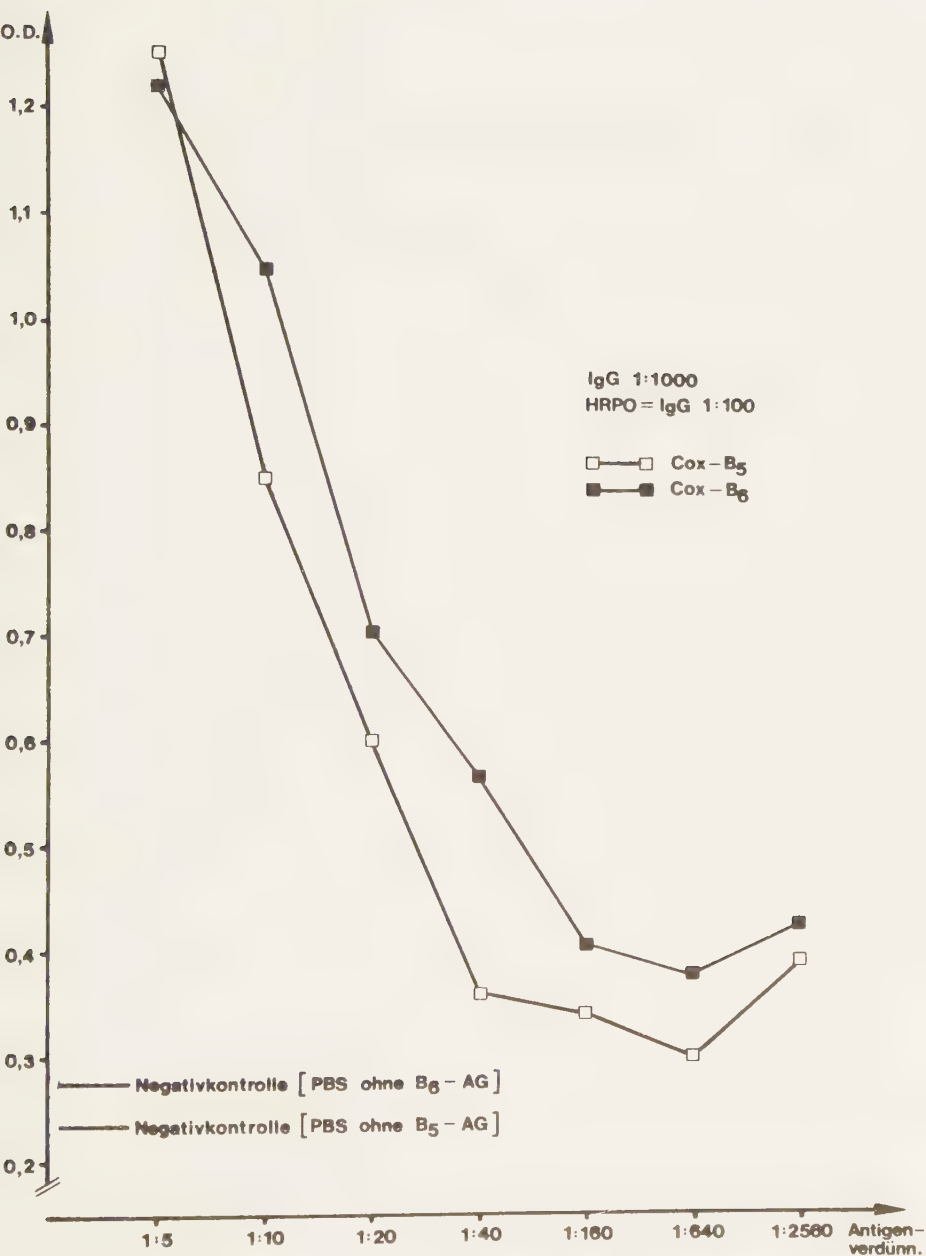


Abb. 4 Antigentitration zur Bestimmung der optimalen Antigenkonzentration im Elisa mit dem Sandwich-Test für Coxsackie B₅ und B₆

Reaktion erreichten optischen Dichte von der im Test verwandten Antigenkonzentration bei den Stämmen Cocksackie-B₁, 4, 5 und 6. Das gecodete Anti-Cocksackie-B-IgG war konstant 1 : 1000 verdünnt. Der peroxidasegekoppelte Antikörper war 1 : 100 verdünnt.

Die Antigenverdünnung, deren O. D. über dem 2,1-fachen Wert der O. D. der Negativkontrolle lag, betrug bei allen 4 getesteten Cocksackie-B-Stämmen 1 : 20. Bei Cocksackie-B₁ war das Antigen bis zu einer Verdünnung von 1 : 20 nachzuweisen, dabei lag die O. D. dann ca. 0,05 über dem Background. Cocksackie-B₄-Antigen wurde bis zur Verdünnung von 1 : 160 nachgewiesen, ebenfalls mit einer Differenz der O. D. von ca. 0,05 zum Background. Cocksackie-B₅-Antigen wurde bis zur Verdünnung von 1 : 20 nachgewiesen, dabei lag die O. D. ca. 0,25 über dem Background. Bei Cocksackie-B₆ war das Antigen bis zur Verdünnung von 1 : 40 nachzuweisen, die O. D. lag dann ca. 0,15 über dem Background. Die höhere O. D. bei Cocksackie-B₅ und B₆ zeigte, daß in diesen beiden Antigenpräparationen eine höhere Antigenkonzentration vorlag als bei Cocksackie-B₁ und B₄. Um im Elisa-Test hohe optische Dichten, die weit über dem Background liegen, zu erreichen, erwiesen sich für das Antigen 1 : 5 und für das HRP0-IgG 1 : 100 als die optimalen Verdünnungen.

3.5. Bestimmung der Empfindlichkeit des Elisa zum
Nachweis von Coxsackie-B-IgM-Antikörpern

Zur Bestimmung der Titerendpunkte wurden Seren aus der Akutphase austitriert. Abb. 5 zeigt die Titration von 4 Seren, die IgM-Antikörper gegen Coxsackie-B₁ aufwiesen. Bei den Patienten 1 und 3 war klinisch eine Myokarditis, bei den Patienten 2 und 4 eine Meningitis diagnostiziert. Alle 4 Seren reagierten bis einschließlich der Verdünnung 1 : 10000 positiv. Abb. 6 zeigt die Titration von 4 Seren, die Antikörper gegen Coxsackie-B₅ aufwiesen. Sie stammten von Patienten mit der klinischen Diagnose Erythema nodosum (Pat. 1), Myokarditis (Pat. 2), Pleuritis sicca (Pat. 3) und Neuralgie (Pat. 4). 2 Seren waren bis zur Verdünnung 1 : 1000 positiv, die beiden anderen Seren nur bis zur Verdünnung 1 : 100.

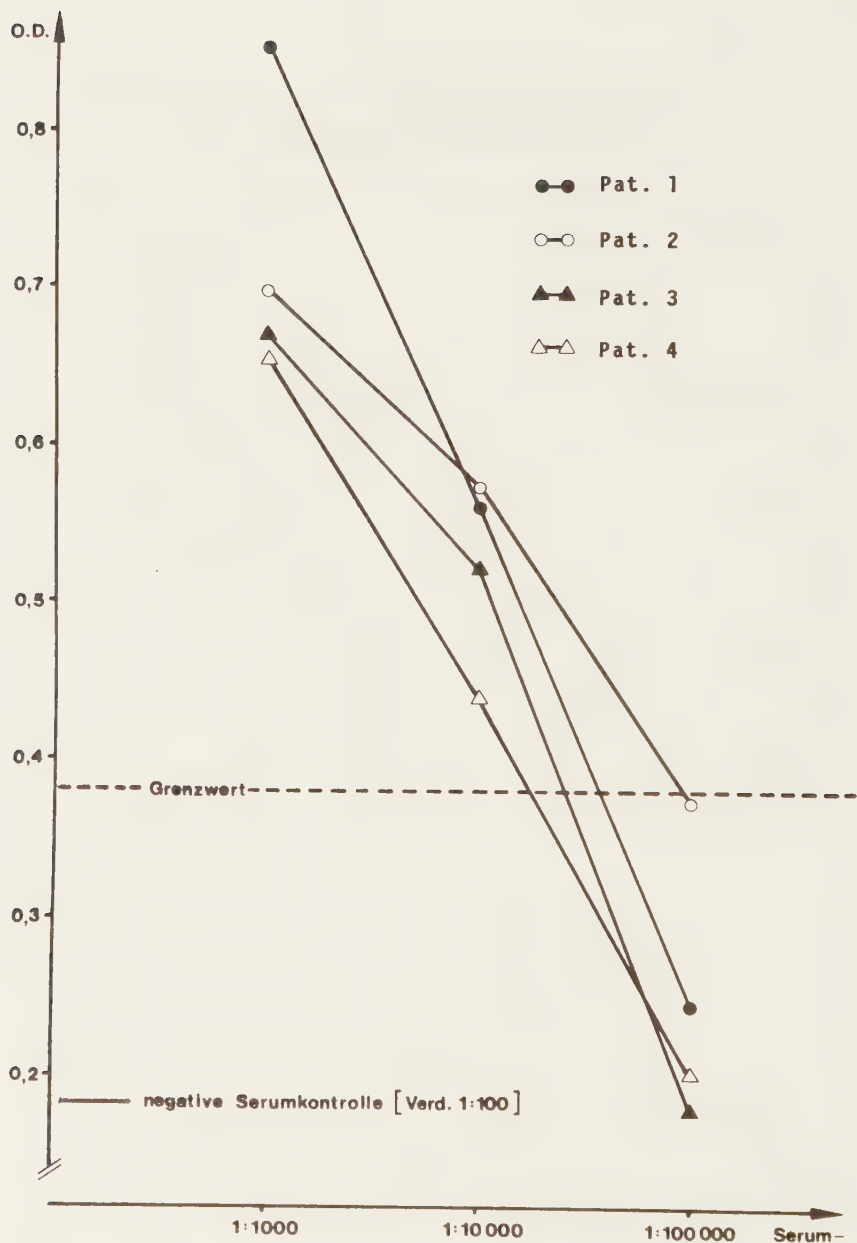


Abb.5 Titration positiver Coxsackie-B₁-Serum zur Bestimmung der Testempfindlichkeit des Elisa

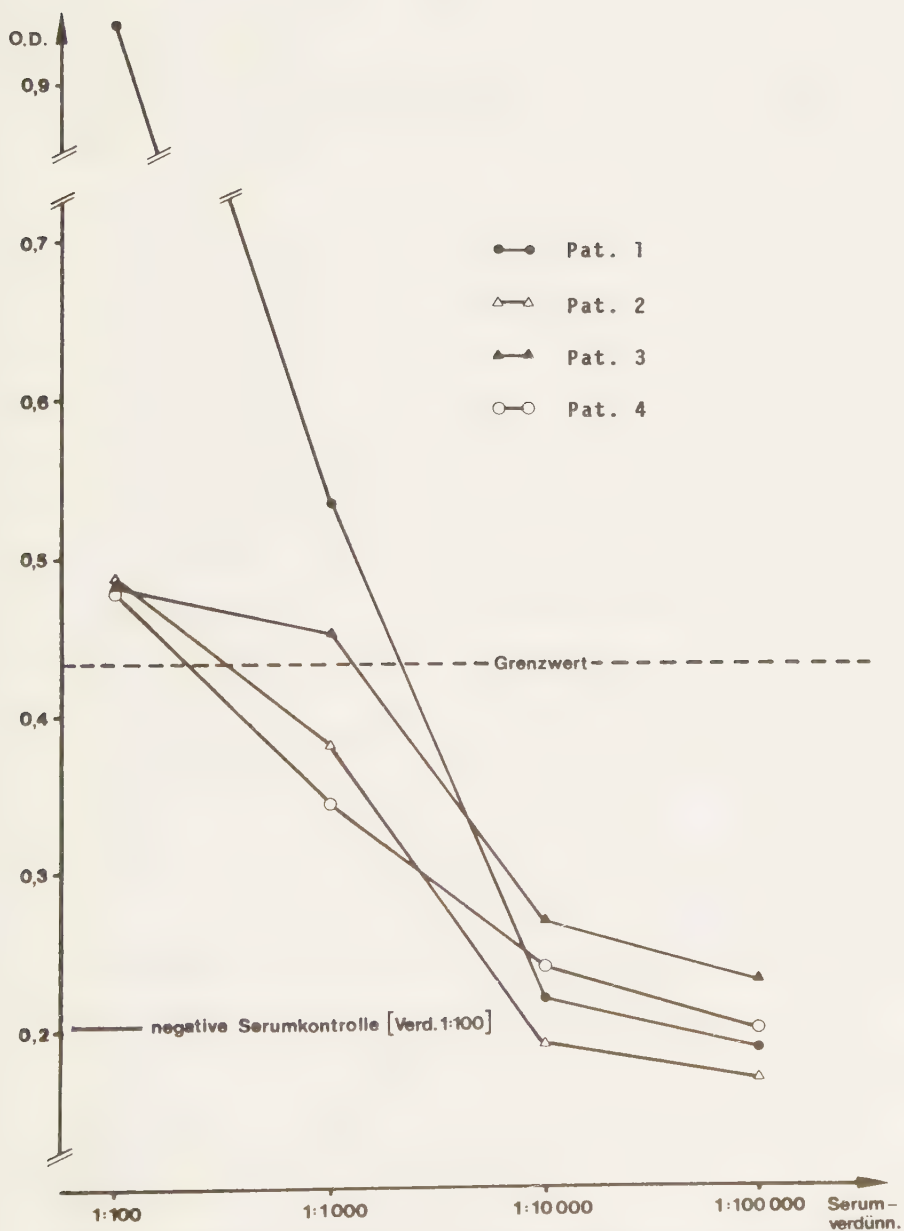


Abb. 6 Titration positiver Coxsackie-B₅-Seren zur Bestimmung der Testempfindlichkeit des Elisa

3.6 Bestimmung der Persistenz von Antikörpern der IgM-Klasse im Elisa zum Nachweis von Coxsackie-B-IgM-Antikörpern

Abb. 7 zeigt die Persistenz von IgM-Antikörpern. Aufgetragen sind die Quotienten aus der O. D. des Patientenserums und der O. D. des negativen Kontrollserums bei 5 Patienten mit einer Coxsackie-B-Infektion. Den Patienten war Blut zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion abgenommen worden. Dabei traten die höchsten Quotienten von 10 bis 11 immer in den ersten Wochen nach Erkrankungsbeginn auf. Ungefähr 3 Wochen nach Krankheitsbeginn waren die Quotienten meist auf etwa die Hälfte abgesunken. Die folgenden 2 Monate fielen sie dann nur noch sehr gering ab. 3 Seren zeigten ca. 10 Wochen nach Erkrankungsbeginn immer noch Faktoren von 3 - 5.

3.7 Kreuzreaktionen von Seren mit verschiedenen Virusinfektionen im Elisa zum Nachweis von Coxsackie-B-IgM-Antikörpern

Es wurde untersucht, inwieweit die Coxsackie-Viren B₁ bis B₅ in dem für jeden Stamm getrennt durchgeführten Elisa-Test kreuzreagieren. Dabei wurden wieder Serumpaa-

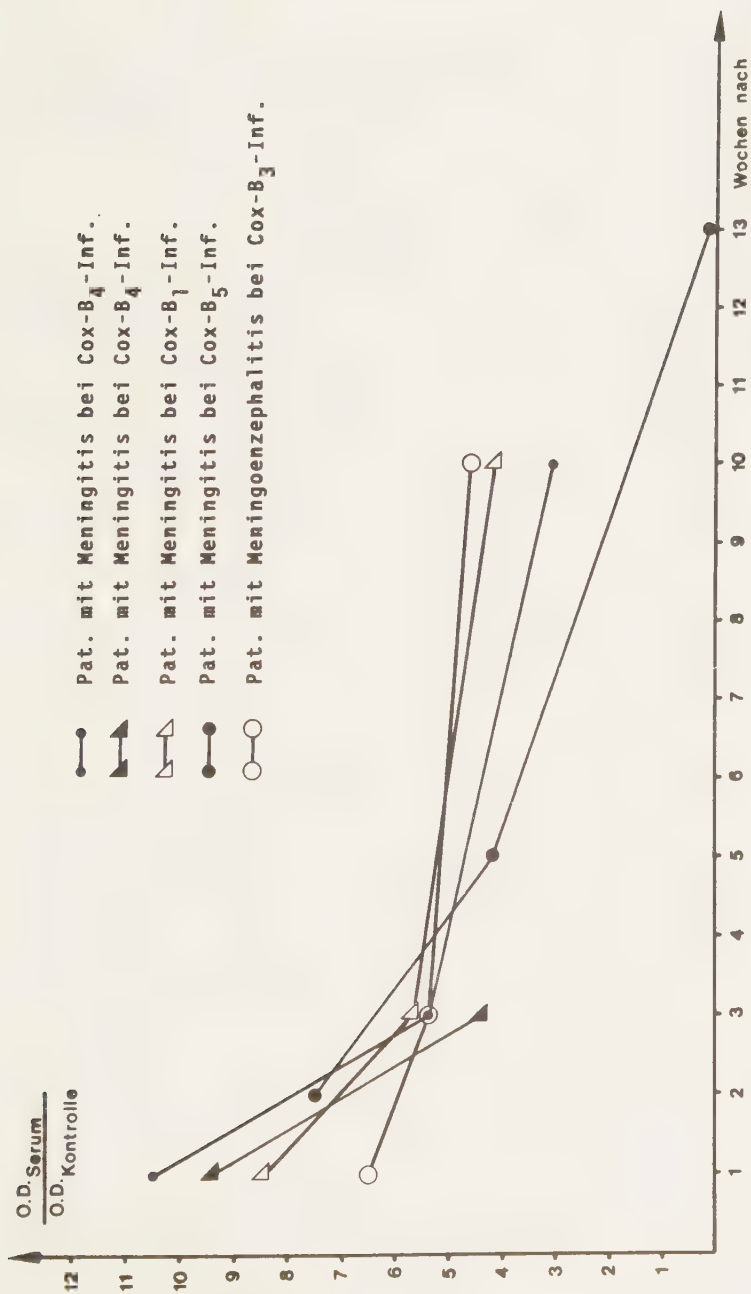


Abb. 7

Bestimmung der Persistenz von spezifischen IgM-Antikörpern durch Testen aus der Akut- und der Rekonvalescenzphase einer Erkrankung im Elisa

re von Patienten verwendet, aus deren Stuhl oder Liquor das entsprechende Virus isoliert worden war. Die isolierten Virustypen waren zum Zeitpunkt der Testdurchführung nicht bekannt, als richtiger Typ wurde der gewertet, der im Test den höchsten Faktor aufwies. Von 2 Coxsackie-B₁-Seren reagierten beide positiv und wurden beide richtig identifiziert. 2 Coxsackie-B₂-Seren reagierten nicht im Test. Von 4 Coxsackie-B₃-Seren reagierten alle 4 positiv, 1 wurde jedoch falsch als Coxsackie-B₁ identifiziert. Von 6 Coxsackie-B₄-Seren reagierten 5 positiv, die auch alle richtig identifiziert wurden. 1 Coxsackie-B₅-Serum war nicht positiv. Es wurden also von 15 Seren 10 richtig typisiert. In Tab. 3 sind die 15 Seren mit den Quotienten ihrer O. D. zusammengestellt.

Zur Untersuchung von Kreuzreaktionen im Elisa-Test für Coxsackie-B-Viren bei anderen Virusinfektionen (Echoviren und Mumps) wurden Serumpaare von Patienten, die in der KBR für Mumps einen signifikanten Titeranstieg hatten oder aus deren Stuhl oder Liquor Echo 9, 11 oder 25 isoliert worden war, im Elisa für die Coxsackie-Typen B₁

Tabelle 3

Kreuzreaktionen von Coxsackie-B-Seren im Coxsackie-B-Elisa-IgM-Test

isolierter Typ	Serum Quotient 0. D. neg. Kontr.				
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅
B ₁	<u>7,9</u>	-	2,0	1,8	3,6
B ₁	<u>5,1</u>	-	2,3	2,6	2,4
B ₂	-	-	-	-	-
B ₂	-	-	-	-	-
B ₃	2,0	-	<u>13,1</u>	-	4,2
B ₃	3,6	-	<u>6,5</u>	3,7	3,2
B ₃	<u>8,0</u>	-	-	-	-
B ₃	-	-	<u>11,4</u>	2,8	-
B ₄	-	-	-	14,1	-
B ₄	2,5	-	2,4	<u>14,8</u>	3,4
B ₄	6,8	3,0	6,1	<u>10,7</u>	5,9
B ₄	-	-	-	<u>10,9</u>	-
B ₄	-	-	-	-	-
B ₄	5,4	-	5,8	<u>18,4</u>	7,1
B ₅	-	-	-	-	-

bis B₅ getestet. Tab. 4 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse.

Von den 9 getesteten Echo-9-Seren reagierten 4 positiv, von den 14 Echo-11-Seren 11, von den 2 Echo-25-Seren 1 und von den 19 Mumpsseren 2. Tab. 5 zeigt eine Auswahl von 10 positiven Echo-Seren mit ihren Kreuzreaktionen im Detail. Es fiel auf, daß bei den Echo-Viren oft erst das Zweitserum, nicht das Erstserum positiv war und es häufig Kreuzreaktionen mit mehreren Coxsackie-B-Typen gab. Die beiden positiven Mumpsseren reagierten nur bei je einem Coxsackie-B-Test (B₃ bzw. B₄).

3.8 Ergebnisse der Testung von Seren von Patienten mit einer Coxsackie-B-Infektion

Insgesamt wurden 1354 Seren aus dem Jahr 1981 von Patienten mit klinischen Symptomen einer Coxsackie-B-Infektion getestet. Bei 37 Patienten wurde im Elisa-Test spezifisches IgM nachgewiesen. Davon hatten nach der klinischen Diagnose 15 Patienten Meningitis, 6 Myokarditis, 3 Perikarditis, 2 ein Exanthem, 2 eine Born-

Tabelle 4

Kreuzreaktionen von Echo- und Mumps-Seren im Coxsackie-
B-Elisa-IgM-Test

Virusinfektion	Zahl der Pat.	Zahl der im Cox-B-Elisa-IgM-Test positiven Seren
Echo 9	9	4
Echo 11	14	11
Echo 25	2	1
Mumps	19	2

Tabelle 5

Im Coxsackie-B-Elisa-IgM-Test positive Echo-Seren und ihre Kreuzreaktionen

isolierter Typ	Erstserum positiv für			Zweitserum positiv für		
	B ₁	B ₄	B ₅	B ₁	B ₄	B ₅
Echo 11				4,2	3,7	8,1
Echo 11				5,9		6,2
Echo 11				14,5		15,2
Echo 9				6,3	5,7	6,8
Echo 9			6,2			8,5
Echo 11		5,6			4,2	
Echo 11			15,5			11,1
Echo 11		5,8			4,5	
Echo 25						4,3
Echo 11			10,3			12,5

holm'sche Krankheit und 9 andere Erkrankungen (siehe Tab. 6).

Von 34 klinisch manifesten Infektionen traten 9 im Alter bis zu 10 Jahren auf, 7 im Alter zwischen 11 und 20 Jahren, 6 im Alter von 21 bis 30 Jahren, 5 im Alter von 31 bis 40 Jahren, 4 im Alter von 41 bis 50 Jahren, 2 im Alter von 51 bis 60 Jahren und 1 in der Altersgruppe 61-70 Jahre. Die Erkrankungshäufigkeit nimmt also mit zunehmenden Alter ab. 22 der 34 Infektionen (= 65%) waren im Alter bis zu 30 Jahren abgelaufen, bei den über 50-Jährigen wurden nur noch 3 Infektionsfälle (= 9%) gefunden (Abb. 8)

Tabelle 6

Klinische Diagnosen bei 37 Patienten, bei denen im Elisa spezifisches IgM gegen Coxsackie-B-Viren nachgewiesen wurde

Diagnose	Zahl der Patienten
Meningitis	15 (40,6%)
Myokarditis	6 (16,2%)
Perikarditis	3 (8,1%)
Exanthem	2 (5,4%)
M. Bornholm	2 (5,4%)
andere Erkr.	9 (24,3%)
Gesamt:	37 (100%)



Abb. 8 Altersverteilung von 34 Patienten, in deren Serum IgM-Antikörper gegen Coxsackie-B-Viren nachgewiesen wurden

4 Diskussion

Da die bisher hauptsächlich eingesetzten Testverfahren zur Diagnostik einer akuten Coxsackie-B-Infektion, Virusisolierung und Nachweis signifikanter Antikörpertiteranstiege im Neutralisationstest, oft keine ausreichend sicheren Ergebnisse erbringen, wurde versucht, in einem Elisa-Test spezifische IgM-Antikörper gegen Coxsackie-B-Viren nachzuweisen.

Elisa-Methoden werden bereits routinemäßig zur Diagnostik von Hepatitis A und B (17, 21), Cytomegalie (50), Röteln (35) und Frühsommermeningoenzephalitis (46) verwandt. Der in dieser Arbeit beschriebene Elisa mit Anti- μ in der Festphase zum Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern bei akuten Coxsackie-B-Infektionen ist eine weitere Möglichkeit, dieses Testverfahren zur Diagnostik einer akuten Virusinfektion einzusetzen. Der Test wurde entwickelt für die Coxsackietypen B₁, B₄, B₅ und B₆, die Entwicklung für die Typen B₂ und B₃ ist bereits in einer früheren Arbeit beschrieben (3).

Das im Test als Antiserum dienende Antigen mußte zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen möglichst rein in hoher Konzentration vorliegen (Titer im NT ca. 10^7) und konnte im Testansatz nur 1 : 5 verdünnt werden, um positive Reaktionen von Seren mit spezifischen IgM-Antikörpern zu gewährleisten. Ein Sandwich-Test zur Be-

stimmung der optimalen Antigenkonzentrationen zeigte, daß Antigenverdünnungen von, je nach Virustyp verschieden, 1 : 20 bis 1 : 160 noch Reaktionen ergaben, die jedoch nur knapp über dem Background lagen. Für die IgM-Teste wurden daher hohe Konzentrationen des Antigens (Verdünnung 1 : 5) gewählt, um eindeutige enzymatische Reaktionen mit hohen optischen Dichten, die weit über dem Wert des Backgrounds lagen, zu erhalten.

Bei der Titration von Seren mit spezifischen Antikörpern im Elisa-Test ergab sich eine hohe, jedoch erheblich schwankende IgM-Antikörper-Konzentration. 4 IgM-positive Coxsackie-B₁-Seren reagierten im Test bis einschließlich der Verdünnung 1 : 10000 positiv, von 4 IgM-positiven Coxsackie-B₄-Seren reagierten 2 bis zur Verdünnung 1 : 1000, 2 nur in der normalen Testverdünnung 1 : 100 positiv. Aufgrund dieser verschiedenen Konzentrationen erwies sich die Standardverdünnung 1 : 100 als am geeignetsten zur Vermeidung von falsch negativen Ergebnissen.

Bei der Testung von Patientenseren aus der Akut- und der Rekonvaleszenzphase einer Infektion ergab sich, daß die spezifischen IgM-Antikörper in einigen Fällen 10 Wochen nach Erkrankungsbeginn immer noch nachzuweisen sind, also eine relativ lange Persistenz vorliegt. Ungefähr 3 Wochen nach Erkrankungsbeginn waren jedoch die Quotienten der Seren aus der Akutphase meist auf etwa die Hälfte abgesunken, in den folgenden 2 Monaten gingen

sie dann nur mehr sehr gering zurück.

Ein Problem stellen die Antigengemeinschaften zwischen den verschiedenen Enteroviren dar. Dörries wies nach, daß bei Coxsackie-B-Infektionen auch IgM-Antikörper produziert werden (15), die mit anderen Serotypen der Coxsackie-B-Gruppe und anderen Enteroviren (z. B. Echoviren) reagieren. Die Testung von 25 Echo-Seren und 19 Mumps-Seren auf Kreuzreaktionen im Elisa für Coxsackie-B-Viren ergab bei den Echo-Seren 16, bei den Mumps-Seren 2 falsch positive Ergebnisse. Die Mumps-Seren reagierten nur mit je einem Coxsackie-B-Typ, dagegen gab es bei den Echo-Seren häufig Kreuzreaktionen mit mehreren Typen. Möglicherweise lagen bei den Mumps-Seren gleichzeitig inapparente Coxsackie-B-Infektionen vor, während bei den Echo-Seren die Kreuzreaktionen wohl eher durch unspezifische Reaktionen bedingt waren. Bei der Untersuchung von Kreuzreaktionen der Coxsackie-B-Typen untereinander wurden von 15 Seren, aus denen ein Coxsackie-B-Virus isoliert worden war, bei 10 Seren der Virustyp im Elisa richtig identifiziert, 1 Serum war in einem heterologen Typ positiv und 4 Seren waren im Test negativ.

Bei der Testung der Kreuzreaktionen zwischen den Coxsackie-B-Viren ergab sich auch, daß die ursprünglich vorgenommene Beurteilung, ein Serum sei positiv, wenn der Wert der O. D. des Serums über dem 2,1-fachen Wert der O. D. der Negativkontrolle liegt, nicht geeignet

ist. Bei einer Reihe von Seren traten Mitreaktionen heterologer Coxsackietypen auf, deren O. D. erheblich über der 2,1-fachen O. D. der Negativkontrolle lag, der homologe Typ konnte jedoch dennoch aufgrund eines mehrfach höheren Quotienten eindeutig identifiziert werden (Tab. 3). Daraus ergibt sich, daß bei jedem Testansatz die O. D.-Werte der getesteten Seren mit den Werten eines definierten positiven und eines definierten negativen Referenzserums verglichen werden müssen, um die Ergebnisse richtig interpretieren zu können.

Bei der Auswertung von 37 Seren, in denen im Elisa spezifische Antikörper gegen Coxsackie-B-Viren nachgewiesen worden waren, bezüglich klinischer Diagnose und Alter der Patienten bestätigten sich im Wesentlichen die Ergebnisse vorausgegangener Untersuchungen. Zwei Drittel der Patienten hatten eine Erkrankung des ZNS oder des Herzens, beim restlichen Drittel wurde eine Vielzahl klinischer Diagnosen gestellt. Fast die Hälfte der Erkrankten war im Alter unter 20 Jahren und nur 9 Prozent der Patienten war über 50 Jahre alt. Die 37 Seren stammten von 1354 Patienten mit Symptomen, die bei einer Coxsackie-B-Infektion auftreten können, insgesamt waren also nur sehr wenige Seren positiv.

Trotz der aufgezeigten Probleme ist der hier beschriebene Elisa sicher eine klinisch relevante

Alternative zum Neutralisationstest in der Diagnostik einer akuten Coxsackie-B-Infektion. Wesentliche Vorteile bestehen darin, daß es ein empfindliches, einfach durchzuführendes Testverfahren ist, daß in kurzer Zeit ohne größeren Aufwand eine große Anzahl von Seren untersucht werden kann, und daß die Ergebnisse rasch (nach ca. 2 Tagen) vorliegen.

Bei einer routinemäßigen Anwendung des Tests ergeben sich sicher aus der praktischen Erfahrung noch Modifikationen im Testansatz, die manche noch bestehende Probleme lösen. Da also zu erwarten steht, daß der Test als Screening-Methode in der Diagnostik von Coxsackie-B-Infektionen zuverlässigere Ergebnisse erbringt als die herkömmlichen Untersuchungsmethoden, ist er sicher eine Bereicherung der diagnostischen Möglichkeiten.

Mit den bisher zur Verfügung stehenden Testverfahren, in erster Linie Virusisolierung und Nachweis signifikanter Antikörpertiteranstiege im Neutralisationstest, ist es oft schwierig, eine akute Coxsackie-B-Infektion ausreichend sicher nachzuweisen. Daraus ergab sich der Versuch, akute Coxsackie-B-Infektionen durch Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern zu diagnostizieren, die in der Regel nur begrenzte Zeit nach erfolgter Infektion im Serum auftreten.

In dieser Arbeit wird die Entwicklung eines Elisa beschrieben, mit dem IgM-Antikörper gegen die Coxsackie-Viren B₁, B₄, B₅ und B₆ im Serum nachgewiesen werden können.

Folgender Testansatz wurde benutzt: Eine Flachboden-Mikrotiterplatte wurde mit Anti- μ beschichtet und mit Patientenserum (1 : 100 verdünnt) für 4 Stunden bei 37° C inkubiert. Über Nacht erfolgte die Inkubation des Serums mit Coxsackie-B₁, 4, 5 und 6-Antigen bei 4° C. In einem weiteren Schritt wurde für den jeweiligen Coxsackie-B-Typ spezifisches, Peroxidase-gekoppeltes IgG aus Kaninchenimmunserum aufgetragen (2 Stunden bei 37° C) und anschließend Substrat (Orthophenylendiamin) zugegeben.

Nach 20 Minuten wurde die enzymatische Farbreaktion mit 2 M Schwefelsäure abgestoppt und die optische Dichte bei 510 nm gemessen. Zunächst wurde ein Serum als positiv gewertet, wenn der Quotient aus O. D. des Patientenserums und O. D. des negativen Kontrollserums über 2,1 lag. Im Verlauf der Untersuchungen ergab sich aber, daß die Ergebnisse nur dann richtig bewertet werden können, wenn bei jedem Testansatz die O. D.-Werte der Patientenseren mit den Werten eines definierten positiven und negativen Referenzserums verglichen werden.

Bei der Titration von Seren mit spezifischen Antikörpern im Elisa-Test ergab sich eine hohe Testempfindlichkeit. Teilweise reagierten die getesteten Seren bis einschließlich der Verdünnung 1 : 10000 positiv, teilweise nur in der normalen Testverdünnung 1 : 100.

Bei der Testung von Patientenseren aus der Akut- und der Rekonvaleszenzphase einer Infektion ergab sich eine relativ lange Persistenz der spezifischen IgM-Antikörper. Es zeigte sich ein Antikörperabfall auf etwa die Hälfte ungefähr 3 Wochen nach Erkrankungsbeginn, nachzuweisen waren die IgM-Antikörper jedoch noch 10 Wochen nach Erkrankungsbeginn.

Die Testung von 25 Seren von Patienten mit Echovirusisolierung und 19 Seren von Patienten mit Mumpsinfektion (nachgewiesen in der KBR) auf Kreuzreaktionen im Elisa

für Coxsackie-B-Viren ergab bei den Echo-Seren 16, bei den Mumps-Seren 2 falsch positive Ergebnisse. Bei der Untersuchung von Kreuzreaktionen der Coxsackie-B-Typen untereinander wurden von 15 Seren, aus denen ein Coxsackie-B-Virus isoliert worden war, bei 10 Seren der Virustyp im Elisa richtig identifiziert, 1 Serum war in einem heterologen Typ positiv und 4 Seren im Test negativ.

Bei der Auswertung von 37 Seren aus einem Kollektiv von 1354 Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer Coxsackie-B-Infektion, in denen im Elisa spezifische Antikörper gegen Coxsackie-B-Viren nachgewiesen worden waren, bezüglich klinischer Diagnose und Alter der Patienten bestätigten sich im Wesentlichen die Ergebnisse früherer Studien, es lagen vor allem Erkrankungen des ZNS und des Herzens vor und die Erkrankungen traten in erster Linie bei jüngeren Patienten auf.

Der hier beschriebene Elisa ist sicher eine klinisch relevante Alternative zum Neutralisationstest in der Diagnostik einer akuten Coxsackie-B-Infektion. Mit einigen Modifikationen im Testansatz, die sich sicher bei einer routinemäßigen Anwendung des Tests ergeben, steht zu erwarten, daß der Test als Screening-Methode in der Diagnostik von Coxsackie-B-Infektionen wesentlich zuverlässigere Ergebnisse erbringt als sie momentan mit den herkömmlichen Untersuchungsmethoden zu erhalten sind.

LITERATUR

- 1 Abraham AA, Cheever FS: Enterovirus infection in a semi-closed community. Med. Microbiol. Immunol. 167, pp. 45-54 (1979).
- 2 Bell EJ, Grist NR : Further Studies of Enterovirus Infections in Cardiac Disease and Pleurodynia. Scand. J Infect. Dis. 2, pp. 1-6 (1970).
- 3 Blobner E: Entwicklung eines Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis spezifischer Antikörper der IgM-Klasse bei akuten Cocksackie-B-Virusinfektionen. Dissertation (1983).
- 4 Bonin O: Quantitativ-virologische Methodik. Eine Einführung. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1973.
- 5 Cambridge G, Mac Arthur CGC, Waterson AP, Goodwin JF, Oakley CM: Antibodies to Cocksackie B viruses in congestive cardiomyopathy. British Heart Journal, 41, pp. 692-696 (1979).
- 6 Committee of the International Enterovirus Study Groups: Picornavirus group. Virology 19, pp. 114-116 (1963).
- 7 Committee on Enteroviruses: Classification of human enteroviruses. Virology 16, pp. 501-504 (1962).
- 8 Committee on Enteroviruses: the enteroviruses. Am J. publ. Hlth. 47, pp. 1556-1566 (1957).

- 9 Craighead JE, Mahoney EM, Carver DH, Naficy K and Fremont-Smith P: Orchitis due to Coxsackie virus group B, type 5. New. Engl. J. Med. 267, pp. 498-500 (1962).
- 10 Curnen EC: The Coxsackie viruses. Ped. Clin. N. Amer. 7, pp. 903-925 (1960).
- 11 Dalldorf G: Coxsackie Group of Viruses. Science 110, p. 594 (1949).
- 12 Dalldorf G: Coxsackie Viruses. Ann. Rev. Microbiol. 9, p. 277 (1955).
- 13 Dalldorf G, Melnick JL, Curnen EC: Coxsackie Virus Group. In Rivers TM and Horsfall FL Jr.: Viral and Rickettsial Infections of Man. 3rd Ed. Philadelphia, JB Lippincott Co., p. 519 (1959).
- 14 Dalldorf G, Sickles GM: An Unidentified, Filtrable Agent Isolated from Feces of Children Paralysis. Science 108, pp. 61 (1948).
- 15 Dörries R, ter Meulen V : Detection of Enterovirus Specific IgG and IgM Antibodies in Humans by an Indirect Solid Phase Radioimmunoassay. Med. Microbiol. Immunol. 168, pp. 159-171 (1980).
- 16 Dörries R, Ter Meulen V: Specificity of IgM antibodies in acute human Coxsackievirus B infections, analysed by indirect solid phase enzyme immunoassay and immunoblot technique. J. gen. Virol. 64, pp. 159-167 (1983).

- 17 Duermeyer W, van der Veen J: Specific detection of IgM antibodies by ELISA applied in hepatitis A. The Lancet 2, pp. 684-685 (1978).
- 18 El-Hagrassy MM, Banatvala JE, Coltart DJ: Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in patients with cardiac and other diseases. The Lancet, pp. 1160-1162 (November 29, 1980).
- 19 Engvall E, Perlmann P: Enzyme linked immunosorbent assay (Elisa). Quantitative assay of IgG. Immunochemistry 8, p. 871 (1971).
- 20 Gelfand HM: The occurrence in nature of the Coxsackie and Echo-viruses. Progr. med. Virol., vol. 3, pp. 193-244 (Karger, Basel/New York 1961).
- 21 Gerlich WH, Lüer W: Selective detection of IgM antibodies against core antigen of the hepatitis B virus by a modified enzyme immune assay. Journal of Medical Virology 4, pp. 227-238 (1979).
- 22 Gordon RB, Lennette EH and Sandrock RS: The varied Clinical manifestations of Coxsackie virus infections. A. M. A. Arch. int. Med. 103, pp. 63-75 (1959).
- 23 Griffiths PD, Hannington G, Booth JC: Coxsackie B virus infections and myocardial infarction: results from a prospective epidemiologically controlled study. Lancet i, pp. 1387-89 (1980).
- 24 Grist NR, Bell EJ and Assaad Fakhry: Enteroviruses in human disease. Prog. med. Virol., vol. 24, pp. 114-157 (Karger, Basel 1978).

- 25 Grist NR, Bell EJ: A six year study of Coxsackie virus B infections in heart disease. J Hyg (Camb) 73, pp. 165-72 (1974).
- 26 Grist NR, Bell EJ: Coxsackie viruses and myocardial infarction. The Lancet, p. 41 (July 2, 1977).
- 27 Hammon WMcD, Yohn DS, Pavia RA: Isolation and characterization of prototype viruses ECHO-26, ECHO-27, Coxsackie B-6. Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 103, pp.164-168 (1960).
- 28 Huebner RJ: Criteria for etiologic association of prevalent viruses with prevalent diseases. Ann. N.Y. Acad. Sci. 67, pp. 430-438 (1957).
- 29 Katze MG, Crowell RL: Immunological studies of the group B Coxsackieviruses by the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) and immunoprecipitation. J. gen. Virol. 50, pp. 357-367 (1980).
- 30 Katze MG, Crowell RL: Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for the detection of Coxsackievirus group B antibodies. J. gen. Virol. 48, pp. 225-229 (1980).
- 31 Kibrick S, Benirschke K: Severe generalized disease (encephalohepatomyocarditis) occurring in the newborn period and due to infection with Coxsackie virus group B: evidence of intrauterine infection with this agent. Pediatrics 22, pp. 857-875 (1958).

- 32 Kibrick S: Current status of Coxsackie and ECHO Viruses in Human Disease. Progr. med. Virol., vol. 6, pp. 27-70 (Karger, Basel/New York 1964).
- 33 Kibrick S: The role of Coxsackie and ECHO viruses in human disease. Med. Clin. N. Amer. 43, pp. 1291-1308 (1959).
- 34 Kibrick S: Viral infections of the fetus and newborn, in Perspectives in Virology, vol. 2, pp. 140-157 (Burgess, Minneapolis 1961).
- 35 Krech U, Wilhelm JA: A solid phase immunosorbent technique for the rapid detection of rubella IgM by haemagglutination inhibition. Journal of General Virology 44, pp. 281-286 (1979).
- 36 Lennette EH, Shinomoto TT, Schmidt NJ, Magoffin RL (1960): Observations on the neutralizing antibody response to group B Coxsackie viruses in patients with central nervous system disease. J Immunol, 86, pp. 257-66 (1961).
- 37 Lerner AM, Wilson FM: Virus myocardiopathy. Progr. med. Virol., vol. 15, pp. 63-91 (Karger, Basel 1973).
- 38 Lim KA, Benyesh-Melnick M: Typing of viruses by combinations of antiserum pools. Application to typing of enteroviruses (coxsackie and echo). From the Department of Virology and Epidemiology, Baylor University College of Medicine, Houston, Texas. Received for publication July 14, 1959.

- 39 Löffler H: Die Coxsackievirus-Gruppe. Handbuch der Virusforschung IV (1958).
- 40 Mayr A, Bachmann PA, Bibrack B und Wittmann G: Virologische Arbeitsmethoden Band II Serologie, Fischer-Verlag (1977).
- 41 Melnick JL: Classification of Hepatitis A Virus as Enterovirus Type 72 and of Hepatitis B Virus as Hepadnavirus Type 1. Intervirology 18, pp. 105-106 (1982).
- 42 Melnick JL, Ledinko N: Social serology; antibody levels in a normal young population during an epidemic of poliomyelitis. Amer. J. Hyg. 54, p. 354 (1952).
- 43 Minor TE, Helstrom PB, Nelson DB, D'Alessio DJ: Counterimmunoelectrophoresis Test for Immunoglobulin M Antibodies to Group B Coxsackievirus. Journal of Clinical Microbiology, pp. 503-506 (Apr. 1979).
- 44 Nicholls AG, Thomas M: Coxsackie virus infection in acute myocardial infarction. Lancet i, pp. 883-84 (1977).
- 45 Rogers NG, Bankhead AS, Crawford IP and Meyer HM: Journal, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 98, p. 227 (1958).

- 46 Roggendorf M, Heinz F, Deinhardt F, Kunz Ch: Serological Diagnosis of Acute Tick-Borne Encephalitis by Demonstration of Antibodies of the IgM Class. Journal of Medical Virology 7, pp. 41-50 (1981).
- 47 Rosen L., Kern JK: Hemagglutination and hemagglutination inhibition with Coxsackie B viruses. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 107, pp. 626-628 (1961).
- 48 Schmidt NJ, Lennette EH: Gel double diffusion studies with group B and group A type 9 Coxsackie viruses. From the Viral and Rickettsial Disease Laboratory, California State Department of Public Health Berkeley, California. Received for publication October 30, 1961.
- 49 Schmidt NJ, Magoffin RL, Lennette EH: Association of group B Coxsackie virus with cases of pericarditis, myocarditis, or pleurodynia by demonstration of immunoglobulin M antibody. Infect Immun, 8, pp. 341-48 (1973).
- 50 Schmitz H, von Deimling U, Flehmig B: Detection of IgM antibodies to cytomegalovirus (CMV) using an enzyme-labeled antigen. Journal of General Virology 50, pp. 59-68 (1980).
- 51 Scott TFM: Clinical syndromes Associated with enterovirus and reovirus infections. Adv. Virus Res. 8, pp. 165-197 (1962).

- 52 Shaw EW, Melnick JL, Curnen EC: Infection of Laboratory Workers with Coxsackie Viruses. Ann. Int. Med. 33, p. 32 (1950).
- 53 Shaw ED, Newton A, Powell AW and Friday CJ: Fluorescent antigen-antibody reactions in Coxsackie and Echo enteroviruses. Virology 15, pp. 208-210 (1961).
- 54 Siegel W, Spencer FJ, Smith DJ, Toman JM, Skinner WF and Marx MB: Two new variants of infection with Coxsackie virus group B, type 5 in young children. A syndrome of lymphadenopathy, pharyngitis and hepatomegaly or splenomegaly or both and one of pneumonia. New. Engl. J. Med. 268, pp. 1210-1216 (1963).
- 55 Sussman ML, Strauss L, Hodes HL: Fatal Coxsackie group B virus infection in the newborn. A. M. A. J. Dis. Child. 97, pp. 483-492 (1959).
- 56 Voller A, Bidwell DE and Bartlett A: The enzyme linked immunosorbent assay (Elisa) - A review with a Bibliography of microplate applications. Published and printed by Flowline Publications, Guernsey, Europe (1977).
- 57 Wiesmann E: Medizinische Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1978.
- 58 Wood SF, Rogen AS, Bell EJ, Grist NR (1977): Role of Coxsackie B viruses in myocardial infarction. Br Heart J; 40, pp. 523-25 (1978).

- 59 Woods JD, Nimmo MJ, Mackay-Scollay EM (1974): Acute transmural myocardial infarction associated with active Coxsackie B infection. American Heart Journal; 89, pp. 283-87 (1975).
- 60 Yolken RH, Torsch V: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection and Identification of Coxsackie B Antigen in Tissue Cultures and Clinical Specimens. Journal of Medical Virology 6, pp. 45-52 (1980).
- 61 Yoon JW, Austin M, Onodera T and Notkins AL: Virus-induced diabetes mellitus. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. New. Engl. J. Med. 300, pp. 1173-1179 (1979).

DANKSAGUNGEN

Herrn Dr. med. M. Roggendorf danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und ganz besonders für seine fachlichen Anregungen und seinen stetigen Einsatz, die zum Entstehen der Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Weiter bedanke ich mich bei Frau Böhm und Frau Köttgen für die stets hilfreiche Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten.

Lebenslauf

Name: Kalleder, Wolfgang
Geburtstag: 28. Oktober 1956
Geburtsort: München
Bekenntnis: römisch-katholisch
Familienstand: verheiratet, 1 Kind
Eltern: Kalleder, Anton Friedrich, geb. am
20.3.1929, kaufm. Angestellter
Kalleder, Mariele, geb. Sebald, geb.
am 31.8.1929, kaufm. Angestellte
Wohnung: 8011 Baldham, Wankstraße 6
Bildungsgang: Volksschule: 1963-1967 in München
Gymnasium: 1967-1976 am humanisti-
schen Wilhelmsgymnasium in
München
Abitur: 25.6.1976
Studium: Humanmedizin an der
LMU in München vom
2.11.1976 bis 5.11.1982
Ärztliche
Prüfung: 5.11.1982
Approbation
als Arzt: 15.11.1982
Doktorarbeit: Experimenteller Teil der vorliegenden
Dissertation im Max von Pettenkofer-
Institut in München (Leiter: Prof. Dr.
F. Deinhardt): 1980-1982
Wehrdienst: 1.7.1976 - 31.10.1976 in München
3.1.1983 - 30.11.1983 in Murnau als
Truppenarzt
Berufliche
Tätigkeit: Seit 1.12.1983 Assistenzarzt im
Bezirkskrankenhaus Gabersee bei
Wasserburg

